

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 26

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU
GLUTATHION

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme supérieur de Pharmacien
de l'Université de Paris

Présentée et soutenue le Juillet 1934.

par

Mlle M.-T. REGNIER

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Licenciée ès-sciences

JURY } MM. TASSILLY, *Président.*
 } FABRE, *Professeur.*
 } BEDEL, *Agrégé.*

PARIS
IMPRIMERIE HENRY
30, Rue Pascal (5°)

1934

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 26

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU
GLUTATHION

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme supérieur de Pharmacien
de l'Université de Paris

Présentée et soutenue le Juillet 1934.

par

Mlle M.-T. REGNIER

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Licenciée ès-sciences

JURY { MM. TASSILLY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
BEDEL, *Agrégé.*

PARIS
IMPRIMERIE HENRY
30, Rue Pascal (5°)

1934

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, doyen, O. *, ☼ I.
LEBEAU, Assesseur, O. *, ☼ I.
P. DESPORT, secrétaire, *, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. *, ☼ I.	Botanique générale.
BEHAL, Membre de l'Inst. G.O. *, ☼ I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☼ I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIERE, O. *, ☼ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☼ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, ☼ I.	Chimie analytique.
GORIS, *, ☼ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, ☼ I.	Physique.
DAMIENS, *, ☼ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, ☼ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☼ I.	Hydrologie et Hygiène
LUTZ, O. *, ☼ I.	Cryptogamie et Micro- biologie.
FABRE, *, ☼ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Professeur sans chaire

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, ☼ I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. *, ☼ I. et
GUERBET, O. *, ☼ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, ☼ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Pharmacodynie.
DELABY, *, ☼ I.	Minéralogie.
PICON, ☼ I.	Chimie minérale.
BACH, ☼ I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, ☼ I.	MM. MASCRE, ☼ I.	MM. BEDEL, ☼ I.
PICON, ☼ I.	FLEURY, ☼ I.	REGNIER, ☼ I.
	BACH, ☼ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☼ I., agrégé chargé des T. P.
de 1^{re} année Chimie générale.
FLEURY, ☼ I. et REGNIER, ☼ I.,
agréés, chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUEGES, ☼ I. Micrographie.
LEROUX, ☼ I. Physique.
DEVAL, *, ☼ I. Microbiologie.
DELABY, *, ☼ I., PICON, ☼ I. et MASCRE, ☼ I. :
agréés, chargés des Travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☼ I.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

*Faible gage de ma reconnaissance
et de mon affection.*

A M. LE PROFESSEUR RENÉ FABRE

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie
de Paris,

Pharmacien en Chef
du Groupe Hospitalier Necker-Enfants-Malades,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

*Témoignage de ma profonde reconnaissance
et de mon respectueux dévouement.*

MEIS ET AMICIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550416_0004

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

La respiration constitue un phénomène biologique général et son arrêt entraîne rapidement la mort; toute cellule, en effet, a besoin d'oxygène pour que puissent s'effectuer les réactions chimiques qui sont à la base de la vie. Aussi la fixation d'oxygène par les organismes a-t-elle attiré depuis fort longtemps l'attention des savants. Dès 1789, Lavoisier et Seguin affirmèrent, dans leur mémoire sur la respiration des animaux, que « les animaux qui respirent sont de véritables corps combustibles qui brûlent et se consomment ». Ils assimilèrent la respiration à une combustion résultant de la combinaison de l'oxygène avec le carbone et montrèrent que les combustions respiratoires augmentent proportionnellement à l'activité des organismes et qu'elles sont l'origine de la chaleur animale et de l'énergie mécanique développée par les animaux.

Pasteur cependant apporta, en 1861, une limitation au rôle de l'oxygène libre, par sa découverte d'organismes puisant l'énergie nécessaire à la vie dans des réactions où cet oxygène libre n'intervient pas. En 1880, A. Gauthier montra que les organismes supérieurs sont capables de telles réactions; il constata que la quantité d'oxygène retrouvée dans la totalité des substances excrétées par un animal dépasse de 20 p. 100 environ la quantité d'oxygène empruntée à l'air respiré. Le 1/5^e de l'oxygène utilisé par les animaux supérieurs est donc fourni par un mécanisme analogue à celui qui préside aux synthèses chez les anaérobies. L'anaérobiose cellulaire est un phénomène fondamental et universel et, en fait, tous

les organismes vivants sont le siège d'oxydo-réductions. l'oxygène libre n'intervenant que pour détruire dans une phase ultérieure les produits formés dans la phase primitive anaérobie.

Les phénomènes d'oxydo-réduction, qui sont à la base de nos connaissances sur la respiration anaérobie des tissus, ont été l'objet, quant à l'explication de leur mécanisme intime, de plusieurs théories. Une controverse s'engagea entre Traube et Hoppe-Seyler, Traube pensant que, dans une oxydo-réduction, un catalyseur agissait sur l'oxygène combiné pour en permettre la migration, alors que pour Hoppe-Seyler l'élément mobile était l'hydrogène.

Dans les tissus, il existe un certain nombre de composés susceptibles de céder facilement leur hydrogène et, dès 1888, de Rey-Pailhade (338) découvrait l'existence d'un corps répandu dans le monde organisé, doué de la propriété d'hydrogéner le soufre à froid pour donner de l'hydrogène sulfuré. Il proposa pour désigner cette substance le nom de « philothion ».

Dans une série de communications, faites à partir de 1888, de Rey-Pailhade (338) montra que cette substance existait dans la levure de bière d'où on pouvait l'extraire par l'alcool à 86° ou l'alcool méthylique (339). La liqueur obtenue, un peu jaunâtre, limpide, à réaction acide, donnait un dégagement d'H²S avec le soufre. Chauffée deux heures à 70°, la liqueur devenait trouble et sans action sur le soufre. Il indiqua, d'autre part, que le philothion existait dans les tissus animaux et qu'on le trouvait dans le règne végétal. Il observa, en outre, que les tissus qui produisent le plus d'hydrogène sulfuré sont précisément ceux qui consomment le plus d'oxygène libre et fut ainsi amené à penser que cet hydrogène labile, existant dans les cellules vivantes, jouait un rôle important dans la respiration tissulaire.

En 1903, Gola (144) montra par l'emploi du test au nitroprussiate, utilisé dès 1901 par Mörner pour l'identification de la cystéine, qu'une substance renfermant probablement le groupe (—SH) se trouvait dans les tissus

végétaux, en particulier lorsque ceux-ci étaient en voie de prolifération.

Peu de temps après, Buffa (60) observait que la même réaction colorée était donnée par certains tissus animaux. Heffter (162), en 1908, vérifiant ces faits, les confirma et attira, en outre, l'attention sur la grande analogie existant entre le pouvoir réducteur des tissus et celui d'un certain nombre de substances, telles que la cystéine, les acides thioglycolique et thiolactique. Il émit dès lors l'hypothèse que les propriétés réductrices des tissus vis-à-vis des colorants et du soufre, étaient dues à la présence d'un corps possédant le groupement (-SH), capable de perdre 2H pour donner le groupement (-S-S-).



Arnold (9), en 1911, montra que la réaction au nitroprussiate était donnée par à peu près tous les tissus animaux; aussi la décrivit-il comme étant une réaction générale des protides. Mais, ayant ensuite remarqué qu'elle était encore donnée par les extraits de tissus débarrassés des matières protéiques, il la rattacha à la présence de cystéine et attribua à cette substance, quoique ne l'ayant pas isolée, la coloration donnée par le nitroprussiate.

Meyerhof (300), en 1918, constata que des cellules de levure traitées par l'acétone, puis lavées à l'eau, perdaient leur activité respiratoire, les substances hydrosolubles paraissant nécessaires à leur respiration. Il remarqua, d'autre part, que l'extrait du lavage était thermostable, bien qu'un chauffage prolongé détruisît progressivement son activité. Enfin, fait intéressant et confirmant les résultats de Heffter, l'activité respiratoire pouvait être restituée par l'acide thioglycolique et l'acide α -thiolactique, alors que de nombreuses autres substances essayées : albumine d'œuf, sérum sanguin, solution d'hémoglobine, nucléine de levure, glycogène, se montraient incapables de réactiver les cellules de levure. Meyerhof (301), ayant, en outre, vérifié la présence d'une

substance à groupement (—SH) dans ses extraits de levure, concluait au rôle joué par (—SH) dans l'activation de la respiration.

Tous ces travaux permettaient de prévoir l'existence d'un corps, possédant le groupement (—SH), répandu tant chez les végétaux que chez les animaux, jouant un rôle important dans la respiration tissulaire grâce à la facilité avec laquelle il libérait de l'hydrogène pour donner un disulfure (—S—S—).

Une étape importante fut franchie lorsque, en 1921, Hopkins (178) réussit à isoler de la levure, du foie et du muscle des mammifères, un constituant cellulaire fonctionnant comme l'acide thioglycolique. Etudiant sa composition, il indiqua que cette substance était un dipeptide formé de cystéine et d'acide glutamique et lui donna le nom de « glutathion ». Ce nom rappelle celui de « philothion » et indique que ce dipeptide est constitué par de l'acide glutamique uni à un composé soufré. La constitution du glutathion fut confirmée par les synthèses de Stewart et Tunnicliffe qui obtinrent la diglutaminyl-cystine, soit sous une forme partiellement racémisée, soit sous une forme lévogyre paraissant identique au produit naturel.

Cette constitution du glutathion, qui semblait cependant bien établie, fut mise en doute par Hunter et Eagles (189). Déjà, Brand et Sandberg (58), ayant préparé du glutathion à partir de sang de bœuf, avaient obtenu un produit ne contenant que 8,6 p. 100 de soufre, au lieu du chiffre théorique de 12,87 p. 100 qu'exigeait la formule du dipeptide. Ils attribuèrent à la présence d'impuretés dans leur produit cette non-concordance de leurs chiffres avec ceux trouvés par Hopkins.

Hunter et Eagles (189), en 1927, essayèrent de préparer du glutathion à partir de sang de porc. Ils employèrent une méthode très voisine de celle de Hopkins. Cependant, le produit obtenu ne répondait pas, même après purification, à la diglutaminyl-cystine. Ils employèrent alors, comme matériel d'extraction, le foie et même la levure; ils constatèrent que, quelle qu'en ait été l'ori-

gine, le produit obtenu était identique, à condition de faire abstraction de la cystine que renferme le foie et qui souillait le produit obtenu à partir de cet organe. Mais toutes ces préparations différaient, par un taux de soufre trop faible et un taux d'azote trop élevé, des produits obtenus par les auteurs anglais. Ils conclurent que le glutathion n'était pas un dipeptide, mais bien plutôt un tripeptide de composition inconnue. Immédiatement, Hopkins (183) fit paraître une courte note, dans laquelle il suggéra qu'une perte de soufre, imputable aux alcalis utilisés, se produisait dans la préparation de Hunter et Eagles. Bergmann et Stather (21) avaient déjà appelé l'attention sur la grande facilité avec laquelle les alcalis provoquaient le départ du soufre du dianhydride de la dialanyl-l-cystine. Se référant à ce travail, Hopkins montra qu'en laissant le glutathion en présence d'alcali, on avait une perte de soufre, et il conclut de la façon suivante : « Quoique je n'aie aucun « doute sur la nature du glutathion, la publication de « l'article de Hunter et Eagles rend désirable que je « donne des précisions plus grandes sur la préparation « du glutathion; j'espère le faire dans un temps prochain. »

Peu de temps après, Johnson et Vøegtlin (193), ayant préparé du glutathion par la méthode de Hopkins, trouvèrent, pour plusieurs préparations, des taux de soufre faibles et des taux d'azote élevés. Ils pensèrent que ces résultats aberrants étaient dus à une faute de technique et la modifièrent de façon à obtenir des produits toujours comparables. Ils conclurent à la nature dipeptidique du glutathion. Cette constitution fut à nouveau mise en doute par Benedict et Newton (20) qui préparèrent, à partir du sang, du glutathion dont le taux d'azote était trop fort et le taux de soufre trop faible pour être de la glutamyl-cystéine. En 1929, Hopkins (184) apporta à sa première technique d'heureuses modifications qui lui permirent de préparer, à partir de la levure ou des globules rouges du sang, un composé sulfhydrylé cristallisé avec un rendement satisfaisant. Ce composé avait tous les caractères extérieurs précédemment décrits comme appartenant au glutathion. Toutefois, dans cette substance, la cystéine était associée

non seulement à de l'acide glutamique, mais aussi à de la glycine¹. Les résultats de son analyse, le taux d'azote aminé ainsi que toutes les autres caractéristiques correspondaient exactement à un tripeptide constitué par les trois aminoacides mentionnés. Ceci confirmait les idées de Hunter et Eagles sur la nature tripeptidique du glutathion et apportait des précisions quant à sa constitution.

L'examen de la structure du glutathion met en évidence la présence d'un hydrogène labile jouant un rôle dans la respiration tissulaire, et fait entrevoir toute l'importance biologique de ce composé. Il nous a semblé intéressant d'en entreprendre l'étude systématique et d'approfondir certains points particulièrement importants.

Il nous fallait, tout d'abord, avoir du glutathion à l'état de pureté. Les méthodes de préparation publiées jusqu'alors ne nous ayant pas donné satisfaction, nous avons dû mettre au point une technique permettant d'obtenir avec un rendement suffisant un produit cristallisé.

Après de nombreux essais, nous avons adopté un mode opératoire qui nous permet, partant de la levure de bière, d'obtenir environ 1 g. 50 de glutathion cristallisé par kilogramme de levure. La mise au point de cette préparation constitue la première partie de notre travail.

Ayant obtenu le glutathion pur, nous en avons contrôlé les caractères physiques et chimiques; nous avons en outre vérifié qu'il répondait bien à la formule généralement admise.

En raison du rôle joué par le glutathion dans les oxydo-réductions tissulaires, nous avons rappelé la théo-

1. Au cours de ce travail, nous désignerons le glycocolle ou acide aminoacétique sous le nom de glycine, cette dénomination ayant été employée par les auteurs anglais et américains qui se sont occupés de la constitution du glutathion.

rie générale de l'oxydo-réduction, puis nous avons souligné et mis en relief l'action du glutathion, transporteur d'hydrogène et tampon régulateur du rH^2 cellulaire, action conforme à ce que laissait prévoir sa formule et, en particulier, son hydrogène labile.

Nous avons ensuite jugé utile de rechercher si le rôle du glutathion, *in vivo*, est aussi important que ses propriétés le laissent prévoir. Avant de procéder à cette recherche, nous avons estimé nécessaire d'étudier sur le produit pur, que nous avions préparé, les différentes réactions proposées pour l'identification du glutathion, puis nous en avons vérifié les conditions d'obtention. En ce qui concerne les procédés de dosage, nous en avons fait une étude critique et nous nous sommes finalement arrêtée à une technique qui nous a paru donner des résultats satisfaisants.

Grâce à cette méthode de dosage, nous avons étudié la répartition du glutathion dans les différents organes, tant à l'état normal que dans divers états pathologiques.

Nous avons ainsi mis en évidence son rôle dans de nombreux problèmes biologiques.

Nous avons alors entrepris l'étude approfondie de l'action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique. Nous avons, pour cela, recherché la dose toxique d'acide cyanhydrique pour le Cobaye; puis, ayant intoxiqué des animaux par cet acide, nous avons tenté de combattre efficacement ses effets toxiques par des injections de glutathion. Les résultats pleinement satisfaisants que nous avons obtenus nous ont amenée à rechercher le mécanisme de l'action du glutathion dans la désintoxication cyanhydrique. Nous avons recherché si le taux du glutathion dans les organes du Cobaye variait selon que cet animal était à l'état normal ou qu'il était soumis à l'intoxication cyanhydrique.

Nous avons voulu vérifier l'hypothèse émise par certains auteurs que l'action antitoxique des dérivés souffrés provenait de la transformation du cyanure en sulfo-

cyanure. Pour cela, nous avons mis au point une méthode colorimétrique très sensible, pour le dosage des cyanures et des sulfocyanures. Puis nous avons dosé ces corps dans les organes de Cobayes ayant subi l'intoxication cyanhydrique ou ayant survécu grâce à l'injection de glutathion.

Pour la présentation de ce travail, nous avons adopté le plan suivant.

PLAN

I. — INTRODUCTION.

II. — PRÉPARATION.

1. Choix de la matière première.
2. Etude des différentes phases de la préparation.
3. Mode opératoire.

III. — PROPRIÉTÉS ET CONSTITUTION DU GLUTATHION.

1. Propriétés du glutathion.
2. Constitution et formule du glutathion.
3. Propriétés oxydo-réductrices du glutathion.

IV. — CARACTÉRISATION ET DOSAGE DU GLUTATHION.

1. Réactions caractéristiques du glutathion.
2. Dosage du glutathion sous la forme réduite.

- a) Exposé critique des diverses méthodes proposées.
- b) Recherche des conditions optima de précision du dosage.
3. Dosage du glutathion existant à l'état oxydé.

V. — LE GLUTATHION CHEZ LES ÊTRES VIVANTS.

1. Diffusion du glutathion chez les êtres vivants.
2. Répartition du glutathion dans les tissus.

VI. — FACTEURS DE VARIATION DU GLUTATHION.

1. Facteurs physiologiques.
2. Action des divers facteurs expérimentaux.
3. Le glutathion dans les états pathologiques.

VII. — RÔLE ANTITOXIQUE DU GLUTATHION.

VIII. — ACTION DU GLUTATHION DANS L'INTOXICATION CYANHYDRIQUE.

1. Généralités sur l'intoxication cyanhydrique.
2. Recherche de la dose toxique d'acide cyanhydrique.
3. Essais de survie, par injection de glutathion.
4. Recherche des variations du taux de glutathion, dans l'intoxication cyanhydrique, avec ou sans administration de glutathion.

5. Recherche d'une microméthode de dosage des cyanures et des sulfocyanures.
6. Dosage des cyanures et des sulfocyanures dans les organes des animaux intoxiqués par l'acide cyanhydrique.
7. Dosage des cyanures et des sulfocyanures dans les organes des animaux intoxiqués par l'acide cyanhydrique et ayant survécu, grâce à l'administration de glutathion.
8. Mécanisme de l'action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique.

IX. — CONCLUSIONS.

Nous remercions très vivement notre Maître, M. le Professeur René FABRE, qui a bien voulu inspirer et guider nos recherches. Nous lui sommes particulièrement reconnaissante du témoignage d'estime qu'il nous a donné, en nous associant à quelques-uns de ses travaux. Nous tenons à l'assurer de notre absolu dévouement et à lui dire toute notre gratitude pour la sympathie qu'il nous a toujours témoignée et pour la sollicitude qu'il nous a si souvent prodiguée.

Nous tenons à dire notre profonde reconnaissance à nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie, dont l'enseignement si varié nous a permis d'aborder les différents points de la question du glutathion. Nous voulons exprimer une particulière gratitude à M. le Professeur LAUNOY, dont les lumineuses leçons de Pharmacodynamie ont grandement contribué à l'orientation de nos recherches vers la physiologie.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. SIMONNET, Professeur à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, qui a bien voulu nous faire profiter de sa grande expérience. Il nous a permis, par les éléments de travail qu'il a mis à notre disposition, de nous familiariser avec les détails de la technique physiologique et de pouvoir faire l'expérimentation sur l'animal, si précieuse pour le pharmacien et pour le toxicologue.

Nous exprimons nos sincères remerciements à M. le Professeur TASSILLY, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous témoignons nos sentiments de respectueuse reconnaissance à M. le Professeur agrégé BEDEL, qui a bien voulu faire partie de notre jury.

CHAPITRE II

PREPARATION DU GLUTATHION

Désirant étudier quelques propriétés du glutathion et rechercher, en particulier, son rôle antitoxique, le premier problème qui s'est imposé à nous a été celui de préparer du glutathion.

Nous avons étudié différentes méthodes dont nous ne donnerons pas ici une description complète, car les détails en seraient fastidieux.

La première méthode proposée par Hopkins (178) nécessitait une série de longues et laborieuses manipulations et conduisait à l'obtention d'un produit impur, avec un rendement insignifiant.

Hunter et Eagles (189), puis Johnson et Vøetglin (193), proposèrent des méthodes aboutissant à un produit plus pur, mais l'obtention en était encore fort laborieuse; on devait passer par de nombreuses étapes, ce qui non seulement compliquait la préparation, mais diminuait également le rendement.

Hopkins (184), en 1929, proposa un mode d'obtention du glutathion qui a, sur la première technique, de très grands avantages. Il traite la levure, pendant 3 ou 4 minutes, à l'ébullition, avec son poids d'eau acidulée avec 0,10 pour cent d'acide acétique. Le mélange est filtré sur des entonnoirs de Büchner alors qu'il est encore chaud. Le papier-filtre est recouvert d'une couche de terre à foulon, nécessaire pour l'obtention d'un filtrat à peu près limpide. Un vide modéré est maintenu et le lendemain le résidu est sec; il est repris par l'eau acidulée et le mélange est traité comme précédemment. Aux filtrats réunis, Hopkins (184) ajoute une solution saturée d'acétate neutre de plomb, puis, par petites frac-

tions et en agitant constamment, du réactif au sulfate mercurique de Denigès. Quand le tout a reposé toute la nuit, le précipité mercurique est bien déposé et le liquide surnageant, quoique non limpide, est siphonné.

Le précipité est égoutté sur des entonnoirs de Büchner. La filtration, grâce au vide, est satisfaisante, quoique un peu lente. Le précipité est alors lavé, puis trituré au mortier et mis en suspension dans l'eau; on le décompose par l'hydrogène sulfuré. Après quarante heures, la décomposition est complète. Le sulfure de mercure est séparé par filtration, puis lavé trois fois en s'aidant du vide. L'hydrogène sulfuré est chassé, puis la solution est acidifiée et le glutathion est précipité par l'oxyde cuivreux. Le sel de cuivre est finalement décomposé par l'hydrogène sulfuré, la solution obtenue est concentrée et le glutathion est séparé par cristallisation dans la solution mère. Nous avons tenté de préparer du glutathion par la méthode d'Hopkins, mais nous nous sommes heurtée à une première difficulté. La suspension de levure obtenue par mélange de ce produit avec l'eau faiblement acidulée forme une pâte, d'où la partie liquide se sépare mal du magma solide. La filtration est très longue et la liqueur obtenue n'est jamais parfaitement limpide. Ce fait a un double inconvénient. Le glutathion, nous le verrons plus loin, est particulièrement instable et a tendance à s'oxyder. Toute manipulation longue risquera donc d'aboutir à une diminution du rendement et à l'obtention d'un produit impur. D'autre part, si, dès le début, on a un produit filtrant mal et donnant une liqueur trouble, les séparations seront difficiles jusqu'à la fin de la préparation. Il semble qu'une substance gommeuse, entraînée dès le début de la préparation, la suit à ses divers stades.

Nous avons voulu alors rechercher si une autre méthode ne serait pas d'exécution plus aisée. Mais, que ce soit la méthode de Kendall, Mac Kenzie et Mason (219) ou celle de Pirie (323), la séparation initiale du liquide et du résidu de levure est toujours laborieuse.

Pirie (323), lors de la description de sa méthode, dit que la filtration, même sur entonnoir de Büchner et en s'aidant du vide, est lente. Après quatre heures envi-

ron, elle s'arrête à peu près complètement. A ce moment, il est préférable, conseille l'auteur, de verser le liquide surnageant sur un autre Büchner et de laisser le gâteau devenir sec. Un vide trop profond ne peut pas être maintenu, car l'éther entre en ébullition. La centrifugation, dans ces diverses méthodes, ne donne pas de résultats meilleurs que la filtration; même en utilisant une centrifugeuse tournant à grande vitesse, on n'arrive jamais à séparer un liquide clair.

Nous avons donc renoncé à ces méthodes et nous avons cherché à mettre au point une technique dans laquelle, par le choix d'un liquide approprié, on arrive à dissoudre le glutathion, tout en réalisant une sorte de défécation de la levure. Dans le but d'améliorer le rendement, nous avons été amenée à étudier minutieusement chaque phase de la préparation.

I

Choix de la matière première

Le glutathion fut isolé par Hopkins de la levure, du foie et des muscles des mammifères; Brandt et Sandberg (58) l'obtinrent à partir du sang de bœuf; Hunter et Eagles (190) le préparèrent à partir de la levure, du sang ou du foie. De ces diverses matières premières, la levure nous a paru offrir le plus d'avantages; il est facile de s'en procurer en quantité aussi considérable qu'on peut le désirer; son taux de dérivés sulfhydrylés est relativement élevé, puisqu'elle peut en contenir jusqu'à 2 grammes et plus par kilogramme. Le sang, au contraire, est relativement peu riche en glutathion; un litre de sang total renferme de 0 g. 30 à 0 g. 50 de dérivés sulfhydrylés localisés exclusivement dans les globules. Le taux est plus élevé dans le foie, mais cet organe offrirait, d'après Hunter et Eagles, l'inconvénient de donner finalement un produit souillé par la cystine qu'il renferme. Pour préparer le glutathion, nous avons donc utilisé la levure de bière, mais comme elle présente des taux très variables de ce produit, il est bon d'en vérifier la teneur avant d'entreprendre l'extraction. Nous avons recherché le taux de dérivés sulfhydrylés de diverses sortes de levures. Pour ces essais, nous avons opéré de la façon suivante.

Dix grammes de levure sont triturés au mortier avec 50 cm³ de solution à 10 pour cent d'acide trichloracé-

tique. On porte au bain-marie, jusqu'à la température de 60°; on laisse refroidir. On filtre sur Büchner, en repassant une seconde fois sur le filtre le premier liquide d'extraction. On complète à 100 cm³ et on effectue, sur une portion aliquote, le dosage iodométrique, selon la méthode de Mme Randoïn et René Fabre ¹.

Le tableau ci-dessous donne les chiffres de glutathion en grammes par kilog de levure. :

G donne le chiffre obtenu en utilisant le nitroprussiate comme indicateur externe.

G' exprime le chiffre obtenu en employant l'empois d'amidon.

TENEUR EN GLUTATHION DE DIVERSES LEVURES

	LEVURE FRAICHE SPRINGER		LEVURE FRAICHE LEGRAND		LEVURE FRAICHE DUMESNIL	
	G	G'	G	G'	G	G'
Echant. N° 1	1 g. 94	2 g. 824	3 g. 07	3 g. 684	1 g. 228	1 g. 657
— N° 2	1 g. 535	2 g. 026	2 g. 55	2 g. 89	0 g. 885	1 g. 06
— N° 3	1 g. 22	1 g. 38	2 g. 735	2 g. 08	0 g. 624	0 g. 910
— N° 4	1 g. 38	1 g. 565	2 g. 328	2 g. 528	0 g. 915	1 g. 235
— N° 5	0 g. 965	1 g. 12	1 g. 86	2 g. 10		

Nous avons toujours trouvé des taux de dérivés sulfhydrylés plus élevés dans la levure de boulangerie que dans la levure de brasserie; aussi est-ce la première que nous employons pour préparer le glutathion. Nous utilisons soit de la levure fraîche, soit de la levure desséchée, à condition que la dessiccation soit opérée dans le vide sec; R. Fabre et H. Simonnet (107) ont montré, en effet, que la dessiccation à l'air provoquait la disparition d'une notable proportion de dérivés sulfhydrylés.

1. Cette méthode est exposée en détail, page 115.

II

Etude des différentes phases de la préparation du glutathion

Nous étudierons successivement les différentes phases de la préparation que l'on peut décomposer ainsi :

1° Obtention, à partir de la levure, d'un liquide contenant le glutathion;

2° Précipitation, au sein de ce liquide, du glutathion sous forme de sel de plomb;

3° Décomposition de ce sel de plomb par l'acide sulfurique et obtention d'une solution encore impure de glutathion;

4° Précipitation du glutathion sous forme de sel de cuivre;

5° Décomposition de ce sel de cuivre par l'hydrogène sulfuré et obtention d'une solution pure de glutathion;

6° Cristallisation du glutathion.

A. — OBTENTION A PARTIR DE LA LEVURE D'UN LIQUIDE CONTENANT LE GLUTATHION.

1. — Choix du liquide à employer pour l'extraction.

Le solvant à employer doit répondre à deux conditions :

a) Il doit extraire le maximum de glutathion d'une levure donnée;

b) Il doit être tel que le liquide contenant le glutathion soit facilement séparable du résidu de levure.

L'extraction du glutathion doit, en effet, être faite rapidement, sinon on risque d'obtenir une substance souillée de ses produits d'oxydation, cristallisant difficilement, et de voir, en outre, le rendement très diminué.

Nous avons essayé un certain nombre de solvants.

EXTRACTION DU GLUTATHION :
AU MOYEN DE DIVERS LIQUIDES

Nous avons employé, pour ces essais, de la levure sèche Springer; 10 grammes de levure sèche sont triturés avec 50 cm³ de solvant; on filtre sur Büchner; le dosage est effectué sur le filtrat, comme précédemment.

SOLVANT EMPLOYÉ	DURÉE DE LA FILTRATION	TAUX DE GLUTATHION
		EXTRAIT EN MG. POUR 10 G. DE LEVURE
Eau distillée	6 heures	52 mg. 5
Alcool éthylique à 100°	2 minutes	0
Alcool méthylique	2 minutes	0
Alcool amylique	10 minutes	0
Alcool butylique	10 minutes	0
Ether officinal	$\frac{1}{2}$ minute	0
Ether de pétrole	6 minutes	0
Acétone	4 minutes	0
Benzène	$\frac{1}{2}$ minute	0
Toluène	$\frac{1}{2}$ minute	0
Pyridine	2 minutes	0
Acide acétique	6 heures	0
Cyclohexane	3 minutes	0
Chloroforme	$\frac{1}{2}$ minute	0

Le glutathion est donc soluble dans l'eau et insoluble dans les autres solvants. Il paraît rationnel d'employer l'eau pour extraire le glutathion de la levure; cependant, si l'eau répond parfaitement à la première condition, elle ne répond pas à la seconde. En effet, la levure triturée avec de l'eau donne, quel que soit le pH, une pâte gluante dont on ne peut séparer facilement la partie liquide, ni par filtration, ni par centrifugation. On peut

remédier à cet inconvénient de plusieurs façons. Hunter et Eagles (190) ajoutent, à la suspension de levure, une solution saturée de baryte jusqu'à ce qu'un bon coagulum soit obtenu; le liquide, à réaction alcaline, est alors centrifugé. Le glutathion n'étant stable qu'en milieu très nettement acide, nous avons rejeté ce procédé et nous avons cherché à obtenir une bonne séparation par addition à l'eau d'un liquide tel que l'extraction soit facilitée, sans que pour cela le rendement soit sensiblement diminué. C'est ainsi que les alcools méthylique, éthylique, amylique, l'éther, le chloroforme, l'acétone, le benzène, le toluène, le cyclohexane ont été essayés.

Nous avons employé pour chaque essai 10 grammes de levure sèche Springer, qui ont été triturés au mortier avec 25 cm³ d'eau distillée mélangés à 25 cm³ des divers solvants. Nous avons dosé les dérivés sulphydrylés sur une partie aliquote de chaque filtrat, en suivant la méthode de Mme Randoin et René Fabre.

EXTRACTION DU GLUTATHION
AU MOYEN D'EAU ADDITIONNÉE
DE PARTIE ÉGALE DE DIVERS SOLVANTS

SOLVANT AJOUTÉ A P. E. D'EAU	DURÉE DE LA FILTRATION	APPARENCE DU FILTRAT	TAUX DE GLUTATHION EN MG. POUR 10 G. DE LEVURE	
			G	G'
Alcool éthylique	5 minutes	limpide	39,91	43,67
Alcool méthylique	5 minutes	trouble	39,28	41,44
Alcool amylique	2 heures	opalescent	31,25	33,77
Alcool butylique	3 heures	opalescent	30,82	32,47
Ether officinal	5 minutes	opalescent	28,45	30,15
Ether de pétrole	15 minutes	opalescent	22,32	23,87
Acétone	15 minutes	opalescent	21,63	24,56
Benzène	20 minutes	2 couches	26,24	28,12
Toluène	20 minutes	2 couches	25,40	27,65
Pyridine	25 minutes	2 couches	25,75	28,05
Acide acétique	30 minutes	limpide	34,78	37,24
Cyclohexane	20 minutes	opalescent	26,10	28,45
Chloroforme	15 minutes	2 couches	22,38	24,54

C'est l'addition, à l'eau, d'alcool éthylique qui donne les meilleurs résultats. Nous avons alors recherché quel était le titre alcoolique qui, tout en donnant un rendement satisfaisant, aboutit, par mélange avec la levure, à une pâte, d'où la partie liquide est facilement séparable.

EXTRACTION DU GLUTATHION

AU MOYEN D'ALCOOL ÉTHYLIQUE A DIFFÉRENTS TITRES

10 grammes de levure sèche Springer ont été traités par 50 cm³ d'alcool ; le dosage a été effectué sur le filtrat après filtration sur Büchner.

DEGRÉ DE L'ALCOOL EMPLOYÉ	DURÉE DE LA FILTRATION.	APPARENCE DU FILTRAT	TAUX DE GLUTA- THION EN MG. POUR 10 G. DE LEVURE	
			G	G'
100°	2 minutes	opalescent	0	0
95°	3 minutes	opalescent	0	0
90°	3 minutes	opalescent	0	0
85°	3 minutes	limpide	0	0
80°	3 minutes	limpide	0	0
75°	3 minutes	limpide	0	0
70°	3 minutes	limpide	0	0
65°	3 minutes	limpide	0	0
60°	4 minutes	limpide	30,15	33,46
55°	4 minutes	limpide	32,67	34,89
50°	5 minutes	limpide	36,88	39,32
45°	8 minutes	limpide	40,76	42,98
40°	30 minutes	trouble	41,24	43,56
35°	2 heures	trouble	43,74	46,53
30°	4 heures	trouble	46,28	48,65
20°	5 heures	trouble	49,20	51,34
10°	6 heures	laiteux	51,28	54,10

Il résulte de ces essais que l'alcool à 45° permet une filtration rapide, avec obtention d'un liquide limpide, tout en donnant un rendement satisfaisant. Avant d'adopter définitivement l'alcool à 45°, nous avons fait des essais d'extraction avec divers liquides se rapprochant plus ou moins du mélange utilisé par Pirie (323) pour la préparation du glutathion.

Nous avons traité 10 grammes de levure sèche Springer par 50 cm³ de liquide, dans les mêmes conditions que pour les essais précédents.

EXTRACTION DU GLUTATHION
AU MOYEN DE DIFFÉRENTS MÉLANGES

MÉLANGES EMPLOYÉS	DURÉE DE LA FILTRATION	TAUX DE GLUTA- THION EN MG. POUR 10 G. DE LEVURE	
		G	G'
Alcool à 90° 30 cm ³ Eau distillée 15 cm ³ Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	13 minutes	18,42	24,56
Alcool à 90° 27 cm ³ 5 Eau distillée 17 cm ³ 5 Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	10 minutes	20,569	26,095
Alcool à 90° 25 cm ³ Eau distillée 20 cm ³ Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	10 minutes	17,499	23,025
Alcool à 90° 22 cm ³ 5 Eau distillée 22 cm ³ 5 Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	12 minutes	22,411	27,016
Alcool à 90° 20 cm ³ Eau distillée 25 cm ³ Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	80 minutes	19,955	22,718
Alcool à 90° 15 cm ³ Eau distillée 30 cm ³ Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Ether officinal .. 4 cm ³ 25	2 heures	19,034	21,49
Alcool à 90° 22 cm ³ 5 Eau distillée 22 cm ³ 5 Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Benzène 4 cm ³ 25	1 heure	29,165	36,226
Eau distillée 22 cm ³ 5 Alcool à 90° 22 cm ³ 5 Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75 Toluène 1 cm ³ 25	70 minutes	23,025	28,174
Alcool à 90° 22 cm ³ 5 Eau distillée 22 cm ³ 5 Ac. sulfurique ... 0 cm ³ 75	50 minutes	30,70	36,84

Aucun de ces derniers mélanges ne nous a donné un rendement comparable à celui obtenu avec l'alcool à 45°. Nous préconisons donc l'emploi du mélange eau et alcool éthylique qui répond le mieux aux nécessités de la préparation. Il faut toutefois que l'alcool ne soit, ni en trop forte proportion, ce qui diminue le rendement, ni en trop faible quantité, ce qui aboutit, par trituration avec la levure, à la formation d'une pâte analogue à celle obtenue avec l'eau pure. L'alcool à 45° semble constituer un seuil; aussi est-ce ce titre alcoolique que nous utilisons pour l'extraction du glutathion.

Si on emploie la levure fraîche, il faut tenir compte, lorsqu'on ajoute l'alcool, de l'eau que contient la levure (environ 70 pour cent). Dans ce cas, du reste, l'alcool joue un double rôle : non seulement il favorise la séparation du liquide extractif du résidu, mais encore, en autolysant les cellules de levure, il solubilise les dérivés sulfhydrylés.

2. — Quantité de liquide à employer pour l'extraction.

Nos expériences nous ont montré que le rendement en glutathion augmentait en *raison directe de la quantité de liquide employé*.

Mais, quelle que soit la proportion de liquide, la levure ne cède jamais tous les corps sulfhydrylés qu'elle contient, même après plusieurs lavages du résidu de la première extraction.

En considération de ces faits d'expérience, nous faisons une première extraction avec 5 volumes d'alcool à 45°, puis un deuxième traitement du résidu de levure avec 2 volumes.

3. — Temps de contact.

La levure est donc intimement mélangée au liquide extractif de façon à obtenir une pâte rigoureusement homogène et sans grumeaux. On centrifuge alors immédiatement, sans laisser plus longtemps en contact le liquide alcoolique et la levure, nos essais, résumés dans le tableau ci-dessous, nous ayant prouvé que la teneur en glutathion n'augmentait pas avec le temps de contact.

VARIATIONS DU TAUX DU GLUTATHION AVEC LE TEMPS DE CONTACT

10 grammes de levure sèche Springer ont été traités par 50 cm³ d'alcool à 45°, puis, après un temps de contact variable, nous avons filtré sur Büchner et effectué les dosages sur une portion aliquote du filtrat.

TEMPS DE CONTACT AVANT LA FILTRATION	TAUX DU GLUTATHION EN MG. POUR 10 G. DE LEVURE	
	G	G'
Filtration immédiate	41,40	48,82
après 15 minutes	41,15	48,49
après 30 minutes	41,10	48,16
après 45 minutes	40,85	45,64
après 1 heure	37,01	39,14
après 8 heures	26,05	29,45

II. PRECIPITATION AU SEIN DE CE LIQUIDE DU GLUTATHION SOUS FORME DE SEL DE PLOMB.

Le pH du liquide, obtenu après centrifugation, est de 5. Nous avons recherché si, par des variations de pH, on obtient une précipitation plus complète du glutathion, tout en n'entraînant que le minimum d'autres corps étrangers. De ces essais, il résulte que le pH 5 convient parfaitement à la précipitation du sel de plomb. Il a, en outre, l'avantage de nous permettre de rester dans les limites d'acidité compatibles avec la stabilité du glutathion et d'éviter toute perte de soufre. Hopkins (178), dans son premier mode de préparation, portait à l'ébullition un mélange de levure et d'eau, puis, après filtration, neutralisait partiellement l'extrait obtenu avant d'opérer la précipitation par l'acétate neutre de plomb. Plus tard, il devait abandonner ce procédé et, après avoir traité la levure à l'ébullition par de l'eau acidulée à 1 pour mille d'acide acétique, il opérait la précipitation par l'acétate neutre de plomb directement dans le filtrat acide. Nous ajoutons au liquide d'extraction une solution saturée d'acétate neutre de plomb. La quantité de sel de plomb nécessaire pour obtenir une précipitation complète varie selon le mode d'extraction et la quantité d'impuretés en présence, un certain nombre de substances étant précipitées en même temps que le glutathion. La fin de la précipitation est facile à déterminer, car nous avons un double critère : d'une part, le précipité se dépose suffisamment vite pour qu'on puisse observer que l'addition d'une petite quantité de solution d'acétate neutre de plomb, dans le liquide surnageant, ne provoque plus de nouvelle précipitation; d'autre part, on peut vérifier que le liquide ne donne plus de coloration rose avec le nitroprussiate ammoniacal. La précipitation étant immédiate, on peut, sans attendre, séparer le précipité, le laver à l'alcool à 45°, puis à l'eau distillée.

**C. — DECOMPOSITION DE CE SEL DE PLOMB
PAR L'ACIDE SULFURIQUE ET OBTENTION
D'UNE SOLUTION IMPURE DE GLUTATHION.**

Le précipité est traité par une solution demi-normale d'acide sulfurique. La décomposition du sel de plomb est rapide et le précipité change immédiatement d'aspect. On centrifuge, puis on lave ce précipité de sulfate de plomb par l'acide sulfurique demi-normal jusqu'à ce que le liquide de lavage, obtenu après centrifugation, ne donne plus de coloration rose avec le nitroprussiate ammoniacal.

On a ainsi une liqueur contenant, outre le glutathion, des produits étrangers. Mais ce passage par le sel de plomb a un double intérêt : il élimine un grand nombre d'impuretés et il permet d'obtenir le glutathion en solution plus concentrée que ne l'était le liquide obtenu à partir de la levure. Or, nous verrons plus loin combien est délicate la précipitation du glutathion sous forme de sel de cuivre et s'il est commode de surveiller cette précipitation lorsqu'on opère sur une petite quantité de liquide, il devient à peu près impossible de le faire lorsqu'on opère sur un grand volume.

Enfin, le passage du glutathion sous forme de sel de plomb ne provoque aucune perte de dérivés sulfhydrylés.

Kendall, Mac Kenzie et Mason (219) ont observé que la proportion d'impuretés dans le liquide extractif conditionnait la précipitation plus ou moins complète du glutathion sous forme de sel de plomb. C'est ainsi que, d'après ces auteurs, si la suspension de levure a été primitivement chauffée, une quantité importante de substances étrangères se trouve dans la solution et la précipitation par l'acétate neutre de plomb est incomplète.

D. — PRECIPITATION DU GLUTATHION SOUS FORME DE SEL CUIVREUX.

Nous avons tenté de précipiter le glutathion par un grand nombre de composés et, en particulier, par les sels de métaux lourds. Nous avons utilisé entre autres le sulfate de cuivre. Si, au liquide contenant le glutathion, on ajoute petit à petit une solution de sulfate de cuivre à 10 pour cent, on obtient rapidement la formation d'un précipité blanc qui ne devient jamais abondant et qui, après lavage et décomposition par l'hydrogène sulfuré, donne une quantité de glutathion qui n'est pas en rapport avec celle que l'on avait primitivement. C'est ainsi que, dans un essai, nous avons opéré la précipitation par le sulfate de cuivre dans 390 cm³ de liqueur, provenant de 300 grammes de levure et contenant 0 g. 670 de glutathion; nous n'en avons retrouvé dans la liqueur obtenue, après décomposition du précipité blanc, que 0 g. 109.

Afin de connaître la raison de ce faible rendement, nous avons recherché quelle était la nature du précipité formé par addition de sulfate de cuivre à une solution de glutathion. Ainsi qu'Hopkins (184) l'avait indiqué, il apparaît que le glutathion est sous forme de sel cuivreux, le sulfate de cuivre étant préalablement réduit par le groupement (—SH); comme le glutathion oxydé ainsi formé n'est pas précipité par le cuivre, on comprend que le rendement soit particulièrement faible. Il vient donc à l'idée d'opérer la précipitation à l'aide d'un sel cuivreux; mais aucun sel cuivreux soluble n'est susceptible d'être utilisé; quant à l'oxyde cuivreux, on sait qu'en milieu sulfurique, il se décompose immédiatement en sulfate cuivrique et cuivre métallique.



Cette décomposition, cependant, n'a pas lieu en présence d'un peptide à groupement (—SH) tel que le glutathion et, par addition d'une suspension d'oxyde cuivreux à une solution sulfurique de glutathion, il y a formation d'un précipité blanc soyeux sans trace de cuivre métallique, tant que l'oxyde cuivreux n'est pas en excès.

La précipitation par l'oxyde cuivreux a l'avantage de sa spécificité. Peu de corps, dans ces conditions, donnent des précipités, et Pirie (324) ne cite que la cystéine, la glycylcystéine et la glycylcystéine-dicétopipérazine. Nous opérons donc la précipitation du glutathion sous forme de sel cuivreux, selon la méthode d'Hopkins.

L'oxyde cuivreux est préparé selon le mode habituel: addition d'un léger excès de glucose à de la liqueur cupropotassique maintenue à la température de l'ébullition. Le précipité rouge vif obtenu est soigneusement lavé à l'eau bouillie, puis séché et conservé dans un flacon convenablement bouché. Au moment de l'emploi, on met en suspension dans de l'eau bouillie une quantité connue d'oxyde cuivreux.

Le liquide contenant le glutathion est titré au moyen d'une solution demi-normale de soude et on ajoute de l'acide sulfurique de façon que la liqueur, dans laquelle on opérera la précipitation, ait une acidité comparable à celle de l'acide sulfurique demi-normal, une telle acidité représentant les conditions optima de précipitation. Celle-ci au début est assez longue à se produire, surtout si on opère à la température ordinaire. Pour l'amorcer plus rapidement, on porte le liquide à 40° environ en le chauffant au bain-marie.

L'addition d'oxyde cuivreux doit se faire lentement, par petites fractions et en agitant vigoureusement. Il faut éviter avec soin tout excès d'oxyde cuivreux qui entraînerait la redissolution du précipité. Celui-ci, blanc soyeux, se dépose assez facilement. A la fin de la précipitation, la coloration rouge de l'oxyde cuivreux disparaît plus lentement, la liqueur surnageante ne donne plus de coloration rose avec le nitroprussiate ammoniacal. Dès qu'un très léger excès d'oxyde cuivreux a été ajouté, le précipité se dépose difficilement, la liqueur surnageante n'est pas complètement limpide et des traces d'oxyde cuivreux souillent le précipité blanc.

Il faut 0 g. 30 à 0 g. 40 d'oxyde cuivreux pour précipiter le glutathion extrait d'un kilog de levure fraîche.

Le précipité est séparé par centrifugation. On le lave à l'eau distillée bouillie par mises en suspension et centrifugations successives, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne contienne plus que des traces de sulfates.

Il faut faire au moins une dizaine de lavages avec chaque fois 3 ou 4 volumes d'eau.

On peut remplacer les centrifugations par des filtrations, mais, le précipité tendant à devenir bleu par oxydation, tout contact avec l'air doit être écarté.

D'autre part, le précipité est ténu et sa séparation nécessite l'emploi de filtres durs, ce qui prolonge le temps de filtration et rend encore plus impérieuse la précaution indiquée précédemment.

E. — DECOMPOSITION DE CE SEL DE CUIVRE PAR L'HYDROGENE SULFURE ET OBTENTION D'UNE SOLUTION DE GLUTATHION.

Le sel de cuivre du glutathion ainsi obtenu est mis en suspension dans 4 volumes d'eau distillée bouillie et traité par l'hydrogène sulfuré arrivant bulle à bulle. La décomposition demande une trentaine d'heures pour être complète.

On obtient un précipité brun noir de sulfure de cuivre que l'on sépare de la solution de glutathion par centrifugation.

Le sulfure de cuivre est convenablement lavé jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de coloration rose avec le nitroprussiate ammoniacal.

On a une solution de glutathion incolore et limpide.

Si l'on désire obtenir du glutathion oxydé, il suffit d'amener la solution à pH 7,5 et de l'aérer jusqu'à ce que le glutathion soit entièrement sous sa forme oxydée.

F. — CRISTALLISATION DU GLUTATHION.

La solution de glutathion ainsi obtenue est relativement diluée (5 grammes pour 100 cm³ environ); on la concentre par distillation dans le vide en chauffant le moins possible et en ne dépassant pas une température de 30°. On peut aider la distillation en faisant circuler un courant d'azote. L'hydrogène sulfuré est ainsi éliminé. On arrête la concentration quand il ne reste que

5 cm³ de liquide par kilog de levure employée. La solution sirupeuse est additionnée d'alcool absolu, petit à petit, jusqu'à ce que le précipité qui se forme se redissolve difficilement. Le liquide ainsi obtenu est versé goutte à goutte dans 10 volumes d'alcool absolu refroidi à 0°. Le mélange est constamment agité. Il se forme un précipité abondant blanc, microcristallin. Lorsque le précipité est bien déposé, on décante la liqueur surnageante et on la remplace par de l'alcool absolu, puis une seconde fois par de l'alcool-éther. Le glutathion est alors rapidement séparé par filtration, séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique et conservé dans un flacon bien sec. En distillant les liqueurs alcooliques et éthéro-alcooliques séparées par décantation, on récupère une quantité importante de glutathion. Cette distillation doit être opérée sous vide à basse température. On obtient finalement environ un gramme cinquante de glutathion par kilog de levure fraîche employée.

Le glutathion ainsi obtenu est en poudre microcristalline. Lorsqu'on veut avoir de beaux cristaux, on opère de la façon suivante : la solution diluée, contenant le glutathion, est traitée par un courant d'hydrogène, qui chasse l'hydrogène sulfuré. On évapore dans le vide, en utilisant un bon dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique. On arrête l'évaporation avant que le produit ne soit sirupeux, c'est-à-dire quand il reste une dizaine de centimètres cubes de liquide par kilogramme de levure employée. On le transvase dans un large cristalliseur et on ajoute alors la moitié de son volume d'alcool; on abandonne le tout dans un dessiccateur à vide. Au bout de 24 heures environ, on voit la cristallisation s'amorcer et la séparation se fait ensuite rapidement.

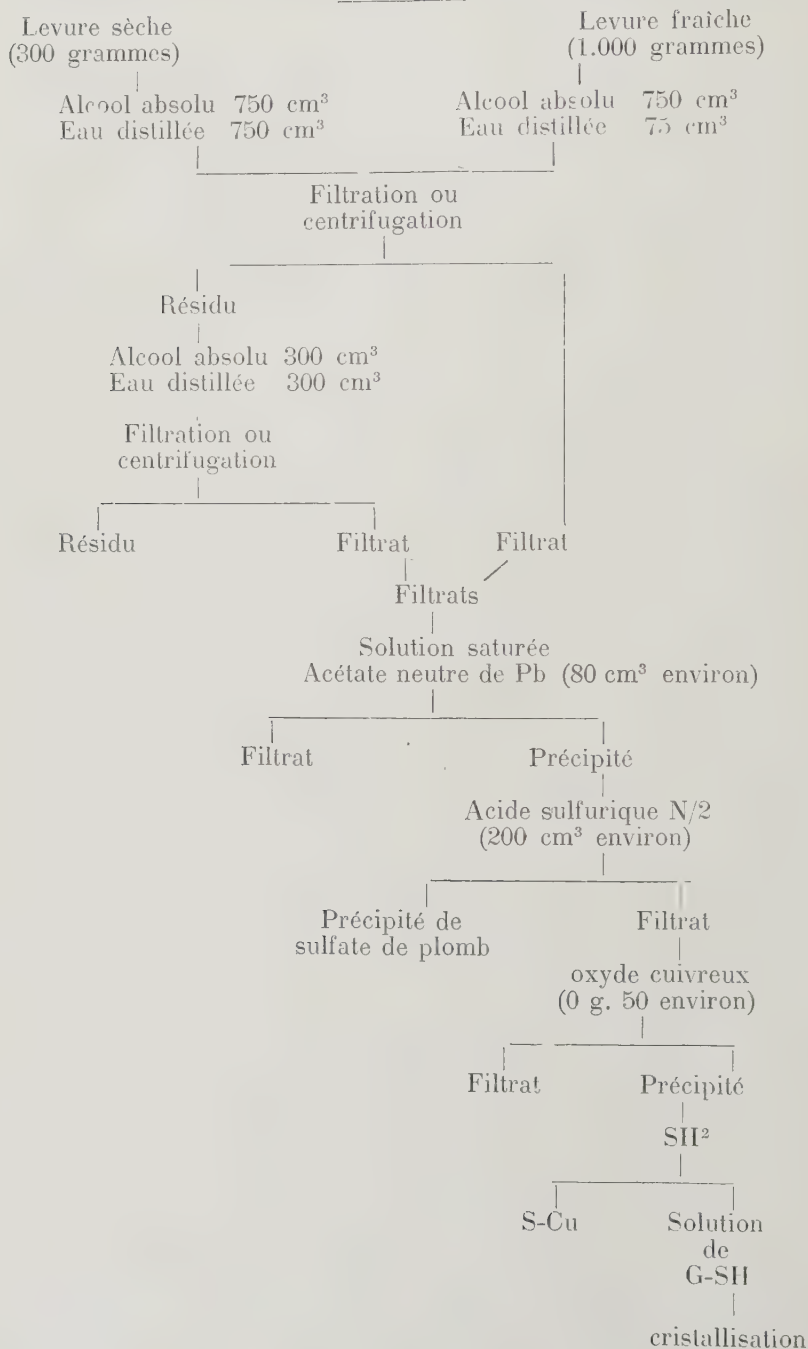
Si la solution devenait sirupeuse avant qu'il n'apparaisse des cristaux, on pourrait amorcer leur formation en frottant les parois du cristalliseur avec un agitateur de verre.

III

Mode opératoire

300 grammes de levure de bière sèche (ou 1.000 grammes de levure fraîche) sont intimement triturés avec 1.500 cm³ d'alcool à 45°. Par filtration ou centrifugation, on obtient un liquide limpide renfermant du glutathion. On reprend le résidu par 600 cm³ d'alcool à 45°, on filtre ou on centrifuge. On mélange les liqueurs limpides et on les additionne de 80 cm³ environ de solution saturée d'acétate neutre de plomb. On filtre ou on centrifuge. Le précipité est traité par 200 cm³ environ d'acide sulfurique demi-normal; on filtre. On ajoute alors au filtrat, par petites portions, une suspension d'oxyde cuivreux, jusqu'à disparition de la réaction au nitroprussiate dans le liquide (environ 0 g. 50 d'oxyde cuivreux). Le précipité obtenu est alors traité par l'hydrogène sulfuré; on a, après filtration ou centrifugation, une solution pure de glutathion qu'il suffit de soumettre à la cristallisation.

SCHEMA DE LA PREPARATION DU GLUTATHION



CHAPITRE III

PROPRIÉTÉS ET CONSTITUTION DU GLUTATHION

Propriétés du glutathion

Le produit, obtenu par la méthode indiquée précédemment, se présente sous forme d'une poudre microcristalline, blanche, légère. Son odeur et sa saveur caractéristiques rappellent, à la fois, la présence du soufre et l'acidité du composé.

Très soluble dans l'eau, le glutathion, ainsi que l'ont montré les essais que nous avons précédemment indiqués, est peu soluble dans les autres solvants; ses solutions aqueuses sont nettement acides.

Le point de fusion, pris au bloc Maquenne, a été trouvé égal à 190°. A cette température, le glutathion fond avec décomposition. Le pouvoir rotatoire, en solution aqueuse à 2 pour cent, est

$$[\alpha]_{\text{H}_2\text{O}}^{45^\circ} = -18^\circ \pm 0,3$$

Nous avons effectué l'analyse élémentaire sur plusieurs échantillons du produit que nous avons préparé. Voici quelques chiffres obtenus.

	C	H	N	S
Echantillon 1	38,65	5,47	13,67	10,44
— 2	38,73	5,51	13,55	10,50
— 3	38,91	5,49	13,68	10,49
— 4	38,61	5,52	13,49	10,45
— 5	38,87	5,48	13,63	10,51
chiffres théoriques	39,09	5,54	13,68	10,42

Les résultats obtenus sont donc parfaitement en accord avec la constitution qu'Hopkins (184) attribua en 1929

au glutathion et qui fut confirmée par les travaux d'Harris (156), puis par ceux de Pirie et Pinhey (327).

Nous avons, d'autre part, dosé le cuivre dans le sel cuivreux de glutathion; les résultats se rapprochent beaucoup du chiffre théorique 17,26 obtenu en considérant sa formule comme étant : $C^{10}H^{16}N^3SO^6Cu$.

Le produit préparé est donc un composé de poids moléculaire égal à 307.

II

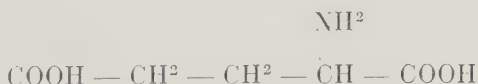
Constitution et formule du glutathion

Harris (156), qui, grâce à l'emploi de la thymolphtaléine, comme indicateur, était parvenu à mettre au point un dosage des acides aminés, fit une étude méthodique de la structure du glutathion qui confirma sa nature tripeptidique. La détermination des groupements (—NH^2) et (COOH) montra que le glutathion était effectivement constitué par de la cystéine, de la glycine et de l'acide glutamique.

Pirie et Pinhey (327), par une méthode différente, aboutirent aux mêmes conclusions. Ils confirmèrent la présence d'un groupement (—SH), d'un groupement (—NH^2) et de deux fonctions (COOH). Ils déterminèrent, en outre, la valeur du pK^1 pour chacun de ces groupements et trouvèrent les valeurs suivantes :

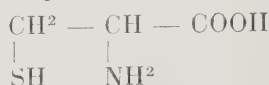
(—SH) : 9,62	(—NH^2) : 8,66
(COOH) : 3,53	(COOH) : 2,12

Le glutathion semble donc bien être constitué par une molécule de glycine ou glycocolle : $\text{NH}^2\text{—CH}^2\text{—COOH}$ une molécule d'acide glutamique :



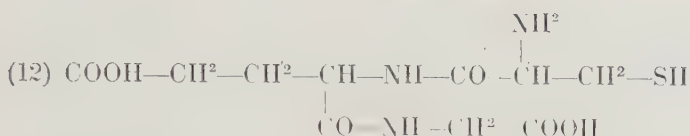
1. pK représente, par rapport à la constante de dissociation K de l'acide, ce que pH représente par rapport à $[\text{H}^+]$.

et une molécule de cystéine :



Mais la formule n'est pas établie pour cela. En effet, on a trois acides aminés et quatre carboxyles, soit douze tripeptides différents répondant à une telle constitution :

- (1) $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (2) $\text{NH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{CH}^2 - \text{SH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{COOH}$
- (3) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (4) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (5) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (6) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{CH}^2 - \text{SH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH}^2$
- (7) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{CH}^2 - \text{SH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{COOH}$
- (8) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (9) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{NH} - \text{CO} - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (10) $\text{COOH} - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}^2 - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$
- (11) $\text{COOH} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \overset{\text{NH}^2}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CO} - \text{NH} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}^2 - \text{SH}$

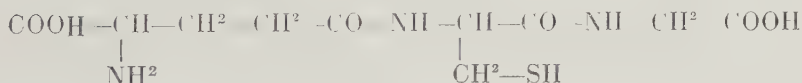


En se basant sur les données jusqu'alors connues et en particulier sur les valeurs des pK, Pirie et Pinhey (327) tentèrent de déterminer laquelle de ces douze formules pouvait être attribuée au glutathion.

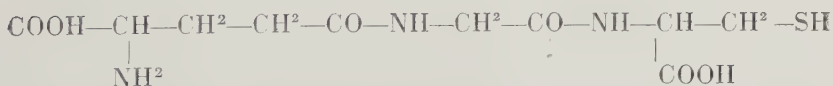
Le pK ($-\text{COOH}$) = 2,12 correspond, soit au groupement carboxyle de l'acide glutamique, à condition que le groupement ($-\text{NH}^2$) soit libre, soit au groupement carboxyle de la cystéine. Les formules 6 et 10 rentrent dans le premier cas, alors que les formules 1, 3, 4, 8, 10 et 11 répondent au second.

Le pK ($-\text{SH}$) de la cystéine et, d'une manière générale, des composés de la forme $\text{HS}-\text{CHR}-\text{COOH}$ dépasse 10; pour le glutathion, le pK ($-\text{SH}$) = 9,62, ce qui semblerait dû au fait que le groupement carboxyle ne serait pas libre; on éliminerait ainsi les formules correspondant au second cas envisagé précédemment, et seules les formules 6 et 10 pourraient être retenues. Ceci est encore confirmé par la valeur du pK (NH^2) qui est habituellement voisin de 8 et qui atteint ici 8,66, ce qui pourrait être expliqué par la présence d'un ($-\text{COOH}$) en α .

Pirie et Pinhey (327) conclurent que les formules :



et :



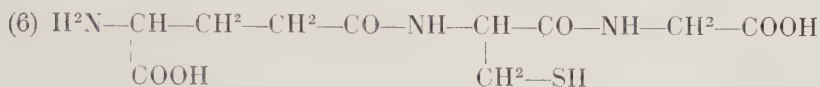
apparaissent comme les plus probables pour le glutathion réduit, la première étant plus satisfaisante que la seconde; mais ni l'une ni l'autre n'expliquent le pK ($-\text{COOH}$) = 3,53, ce chiffre étant trop élevé pour un carboxyle voisin d'une liaison peptidique et trop faible pour un carboxyle habituel.

Kendall, Mac Kenzie et Mason (219), en 1929, essayèrent à leur tour de déterminer de quelle manière les trois amino-acides étaient combinés. Par traitement du glutathion à l'acide nitreux, ces auteurs séparèrent la glycine à l'état d'acide hippurique, mais l'acide glutamique ne put être isolé. Leurs conclusions confirmèrent donc ce qu'avaient déjà trouvé Quastel, Stewart et Tunnicliffe (331), à savoir que le groupe aminé libre était celui de l'acide glutamique et que, de plus, la liaison de la glycine devait se faire par la fonction amine et non par le carboxyle. Toutefois, cela n'indiquait pas si la liaison était faite avec le carboxyle de l'acide glutamique ou avec celui de la cystéine. Les auteurs ayant fait agir l'eau oxygénée en présence d'ammoniaque, il se dégaga de l'anhydride carbonique et, après hydrolyse, on ne put isoler, ni l'acide glutamique, ni la glycine, mais seulement de l'acide succinique. Ils pensèrent que cela pouvait être dû au fait que le (—NH^2) de la glycine était accouplé au carboxyle en α de l'acide glutamique. Le glutathion serait donc la glutamyl-glycine-cystéine.

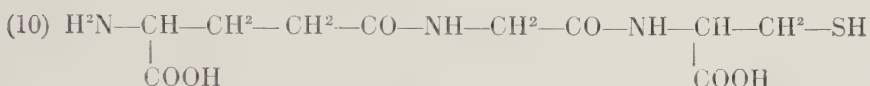
Quelques mois plus tard, après une étude plus complète de la question, les mêmes auteurs devaient arriver à la conclusion de Pirie et Pinhey, c'est-à-dire que le glutathion devait être : soit la glutamyl-cystéinyl-glycine, soit la glutamyl-glycyl-cystéine.

C'est Nicolet (315) qui, le premier, devait indiquer que le glutathion était la glutamyl-cystéinyl-glycine. Il fit, en effet, une étude systématique de la structure du glutathion. Il remarqua tout d'abord que six tripeptides, parmi les douze possibles, peuvent être éliminés en se basant sur le fait que le groupe (—NH^2) libre est celui de l'acide glutamique. Seules restent possibles les formules : 3, 4, 6, 7, 8, et 10. D'autre part, Hopkins (184) ayant observé qu'une solution aqueuse de glutathion, portée à l'ébullition durant plusieurs heures, donne l'anhydride de la dicétopipérazine glycyl-cystéyl, il semble démontré qu'il existe une liaison peptidique entre la glycine et la cystéine, et de ce fait deux formules sont encore à éliminer, soit les tripeptides 3 et 4. L'étude des produits d'oxydation du glutathion conduit à admet-

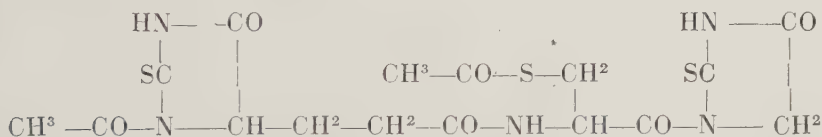
tre que le (—COOH) en γ de l'acide glutamique fait partie d'une liaison peptidique, ce qui supprime la possibilité des associations 7 et 8. Deux formules restent capables de représenter la structure du glutathion, soit :



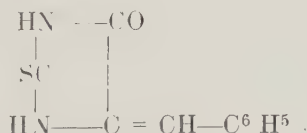
et :



Cette conclusion, quoique obtenue par un raisonnement différent, est absolument conforme à celles de Pirie et Pinhey (327) et de Kendall, Mason et Mac Kenzie (219); mais Nicolet (315) parvint, en outre, à établir laquelle des deux formules était celle du glutathion. Il traita directement le glutathion par le sulfo-cyanate d'ammonium et l'acide acétique, selon le mode habituel de préparation des thiohydantoïnes à partir des acides aminés. Il obtint un produit jaune, solide, qu'il conclut après analyse élémentaire être une bis-thiohydantoïne de formule :



Ce produit condensé avec la benzaldéhyde, et traité par les alcalis, donne, après réacidification, la benzal-thiohydantoïne :

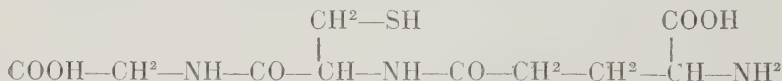


qui fut parfaitement identifiée. La glycine existant dans le glutathion a pris part à la formation d'une des chaînes de la bisthiohydantoïne, ce qui démontre clairement que, dans le glutathion, le carboxyle de la glycine doit être libre. La formule 6 est donc seule acceptable.

Ce résultat devait, peu après, être confirmé par Kendall, Mason et Mac Kenzie (222). Si le glutathion était la glutamyl-glycyl-cystéine, l'éthérisation du carboxyle de la glycine provoquerait la mise en liberté de la cystéine; or, les produits de la réaction ne donnent pas la réaction de Sullivan ¹, caractéristique de cet acide aminé.

Un certain nombre de faits d'ordres différents prouvent que cette formule est bien celle du glutathion. C'est ainsi que Grassmann, Dyckerhoff et Heibeler (145) ont prouvé que le glutathion n'était hydrolysé ni par les protéinases, ni par les dipeptidases, ni par les aminopeptidases. Il l'est au contraire rapidement par la carboxypeptidase du pancréas. Cette action enzymatique cesse quand la moitié des liaisons peptidiques du tripeptide est hydrolysée et libère de la glycine. Il faut en conclure que la glycine est située à l'une des extrémités de la chaîne tripeptidique.

Tout cet ensemble de constatations démontre que le glutathion est la glutamyl-cystéinyl-glycine.



Le glutathion, qu'on peut schématiquement représenter par G-SH, perd facilement l'hydrogène du groupement sulfhydrylé pour s'unir, molécule à molécule, en donnant le disulfure ou glutathion oxydé :



Cette réaction est réversible, elle est à la base de toute la chimie du glutathion, et la connaissance de son mécanisme est nécessaire pour la compréhension des oxydations intra-cellulaires; aussi allons-nous l'étudier avec quelques détails.

1. Cette réaction est exposée page 79.

III

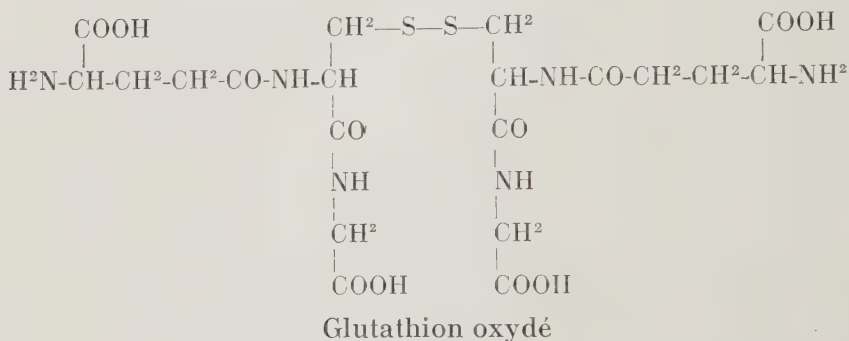
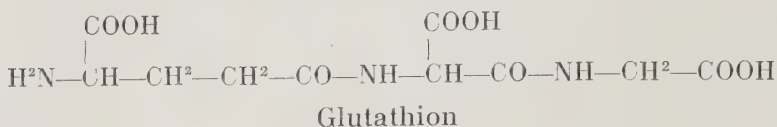
Propriétés oxydo-réductrices du glutathion

De nombreux composés : glucides ou protides, ne sont pas spontanément autoxydables en présence de l'oxygène moléculaire, tout au moins à une température et à un pH conciliables avec la vie. Si, du point de vue thermodynamique strict, tous ces corps ont tendance à s'oxyder, cette oxydation nécessite un laps de temps tel qu'elle échappe à notre observation. L'action d'un facteur dont le rôle serait d'accélérer les réactions permettrait donc seule d'expliquer que, dans les tissus animaux ou végétaux, des quantités appréciables de substances organiques soient oxydées. On conçoit que la recherche de telles actions, mises en jeu par la cellule vivante, ait fait l'objet de nombreux travaux.

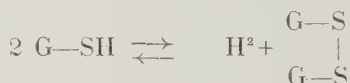
Les processus d'oxydation, du genre de ceux auxquels président les phénoloxydases, découvertes et étudiées par Gabriel Bertrand, où l'oxygène de l'air joue le rôle essentiel, ne sauraient rendre compte de la mobilisation de l'oxygène au cours du métabolisme normal. En effet, ces diastases ont une sélectivité telle que leur action ne peut être généralisée; d'autre part, toutes les oxydations tissulaires se produisent à l'abri de l'air et, dans ce cas, elles sont nécessairement couplées à des processus de réduction, l'oxygène et l'hydrogène étant empruntés aux constituants du milieu.

Il semble que, parmi les substances capables de provoquer ces oxydo-réductions, le glutathion joue un rôle

de premier plan. Ce tripeptide possédant un groupe (—SH) donne par oxydation le disulfure ou glutathion oxydé :



On passe réciproquement, même sous l'influence des réducteurs les plus faibles, tels les cyanures, de la forme oxydée à la forme réduite. On peut représenter schématiquement ces réactions de la façon suivante :



Ceci amène à considérer le radical (—S—S—) comme un intermédiaire accepteur d'hydrogène, facilitant le transport de celui-ci. Cet hydrogène pourrait d'ailleurs provenir, comme dans l'hypothèse de Bach, des molécules d'eau, tandis que les constituants des tissus agiraient les uns comme des accepteurs d'hydrogène, les autres comme des accepteurs d'oxygène.

La réaction réversible :



fait apparaître le glutathion non seulement comme un transporteur d'hydrogène, mais aussi comme un régulateur du potentiel oxydo-réducteur des tissus, comme un tampon du rH².

La cellule renferme en quantité notable des bicarbonates alcalins, des protides amphotères qui jouent le rôle de « tampons », s'opposant à toute variation importante du pH; on conçoit qu'il existe des mécanismes régulateurs comparables, vis-à-vis de la concentration en molécules H^2 .

Il existe, en effet, pour un pH donné, un équilibre réversible entre la forme oxydée et la forme réduite, cet équilibre correspondant à un rH^2 fixe. Si la concentration en molécules H^2 vient à augmenter dans les tissus, une fraction du glutathion oxydé se transforme en glutathion réduit; et inversement, si la concentration en molécules H^2 vient à diminuer, la forme réduite cède son hydrogène de façon à rétablir l'équilibre. Il y a donc une stabilisation du potentiel oxydo-réducteur.

Le glutathion semble donc avoir *in vivo* une double action; d'une part, son intervention comme transporteur d'hydrogène le rend susceptible de jouer un rôle capital dans la synthèse des constituants essentiels de la cellule; et, d'autre part, son rôle de tampon du rH^2 lui permet d'assurer la constance des propriétés physico-chimiques des milieux cellulaires, constance indispensable à la vie.

Cette double action, le glutathion la doit à ses propriétés oxydo-réductrices; aussi semble-t-il intéressant d'en étudier le mécanisme et de rechercher l'influence des divers facteurs vis-à-vis de ces propriétés.

L'étude expérimentale de l'oxydation du glutathion a été entreprise par de nombreux auteurs et ils ont rapproché le glutathion, quant à ses propriétés oxydo-réductrices, des autres dérivés sulfhydrylés et en particulier de la cystéine.

D'après Harrison (157), en effet, la différence d'oxydation existant entre la cystéine et le glutathion serait une question de degré plutôt que de qualité. Le glutathion, aussi bien sous la forme de thiol que sous celle de disulfure, étant plus facilement soluble que la cystine, il serait plus apte à subir les oxydo-réductions réversibles que le système ($cystine \rightleftharpoons cystéine$).

Cette étude des propriétés oxydo-réductrices des dérivés sulfhydrylés peut être faite soit en présence de l'oxygène atmosphérique, soit à l'abri de l'air; dans ce

dernier cas, on suit généralement la marche de la réaction en opérant en présence de colorants comme le carmin d'indigo, le bleu de méthylène; ces substances, quand elles agissent comme accepteur d'hydrogène, donnent, en passant sous la forme du leuco-dérivé incolore, la preuve qu'un système oxydo-réducteur a été établi. Ce mode opératoire décrit primitivement par Thunberg a donné des résultats d'un grand intérêt.

A. — INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS.

1. — Influence du pH.

La transformation réversible (glutathion réduit $\rightleftharpoons$ glutathion oxydé) est extrêmement sensible à la réaction du milieu et, en 1921, Hopkins (178) en avait fait la remarque, à propos du pouvoir réducteur des tissus vis-à-vis du bleu de méthylène. On constate, en effet, que l'addition de glutathion oxydé accélère nettement la réduction du colorant, si on opère en milieu alcalin; mais en milieu acide, au contraire, l'addition du disulfure détermine une diminution ou même un arrêt de la réduction. Ces faits peuvent s'expliquer de la façon suivante : le glutathion oxydé ajouté aux tissus donne du glutathion réduit. En milieu alcalin, celui-ci cède facilement son hydrogène labile qui réduit le bleu de méthylène; en milieu acide, au contraire, le glutathion réduit est stable et la forme disulfure agit alors en compétition avec le colorant pour l'utilisation des hydrogènes labiles en présence.

Meyerhof (302), en 1923, avait observé que la lécithine et l'acide linoléique étaient oxydés sous l'influence d'un composé sulfhydrylé tel que l'acide thioglycolique. Il pensa que cette oxydation pouvait être analogue à celle produite par le glutathion dans les muscles, mais il n'observa pas d'oxydation des protides par les dérivés sulfhydrylés. Hopkins (181) étudia l'influence du glutathion sur l'oxydation des protides et des graisses

(huile de lin, acide linoléique, mélange d'acides gras, etc.). A un pH voisin de 3,5, qui est vraisemblablement celui auquel opéra Meyerhof, Hopkins trouva des résultats comparables à ceux trouvés par celui-ci. Mais il montra que le comportement de ces substances se modifie, si on fait varier le pH. A la neutralité, l'oxydation des graisses est limitée, mais encore nette, et l'oxydation des protides est très sensible.

Tunncliffe (374), recherchant l'influence du pH sur le pouvoir réducteur des tissus, observa que ce pouvoir diminuait de moitié si on passait du pH 7,6 au pH 6,2; mais, en présence de glutathion oxydé, cette même différence de pH provoquait une diminution du pouvoir réducteur qui n'était plus, à pH 6,2, que le tiers de la valeur primitive.

Mathews et Walker (293) avaient signalé que, dans l'autoxydation de la cystéine, il y avait un maximum à pH 7,5 avec chute rapide de part et d'autre. Le même phénomène se produit avec la plupart des dérivés sulfhydrylés et Dixon et Tunncliffe (96) l'ont étendu au glutathion réduit, mais la chute n'est nette que du côté acide; la position du maximum dépendrait jusqu'à un certain point du tampon utilisé et elle serait obtenue pour une valeur du pH, plus élevé en tampon de phosphate qu'en tampon de borate.

2. — Influence des métaux.

Les travaux de Mathews et Walker (293), de Warburg et Sakuma (406), de Toda (370) et Harrison (157) et de plusieurs autres auteurs, ont montré que des traces infimes de certains métaux, tels que le fer, le cuivre, étaient capables de produire une grande accélération de l'oxydation, tant aérobie qu'anaérobie, des dérivés sulfhydrylés comme la cystéine et le glutathion. Quand l'effet de ces métaux a été éliminé par une purification rigoureuse des dérivés sulfhydrylés, le taux d'absorption d'oxygène et le taux de réduction du bleu de méthylène, par ces dérivés sulfhydrylés, sont très réduits.

a) *Fer.*

L'accélération de l'oxydation atmosphérique de la cystéine par de petites quantités de fer fut d'abord montrée par Mathews et Walker en 1909, qui observèrent que la rapidité de la réaction était doublée par l'addition de chlorure ferrique M/100.000.

Harris (152), en 1922, étudia l'action catalytique de divers métaux sur l'autoxydation de la cystéine; il proposa une théorie d'après laquelle, dans le cas du fer, un complexe ferreux-cystéine se formerait tout d'abord et s'oxyderait au contact de l'air pour donner un complexe coloré ferrique-cystéine qui, à son tour, se transformerait rapidement, par réduction, en complexe ferreux-cystéine aux dépens de la cystéine qui, de ce fait, serait oxydée à l'état de cystine.

Warburg et Sakuma (406), en 1923, émirent à leur tour l'hypothèse que ce qu'on appelait l'autoxydation de la cystéine était en réalité une catalyse par des traces de fer. Ils prétendirent que l'oxydation de la cystéine serait due à la formation d'un complexe intermédiaire cystéine-fer qui est autoxydable. En utilisant des appareils de quartz et en prenant des précautions spéciales pour éliminer le fer, ces auteurs ont obtenu des échantillons de cystéine qui ne subissent que très lentement l'oxydation.

Abderhalden et Wertheimer (1) discutèrent ces résultats et attachèrent une grande importance à la petite oxydation résiduelle que Warburg et Sakuma avaient trouvée dans leurs échantillons les plus purs de cystéine. Ces derniers, reprenant leurs essais, en travaillant dans du matériel en verre, préparèrent de la cystéine exempte de fer et cependant autoxydable.

Toda (370) trouva, par la suite, des résultats comparables à ceux de Warburg et Sakuma. Une solution de cystéine, neutralisée par l'ammoniaque, est additionnée d'une solution de bleu de méthylène, à la température du laboratoire et à l'abri de l'air. La disparition de la teinte bleue est plus ou moins rapide et s'effectue en 25 minutes par exemple. Après purification de la cys-

téine, de l'ammoniaque et du bleu de méthylène de façon à éliminer le fer, la décoloration ne se fait qu'en cinq heures, mais si on ajoute au début de la réaction des traces de sulfate ferreux, la disparition de la teinte bleue se fait en 7 minutes.

Harrison (157), en 1924, confirma ces résultats et les étendit au glutathion, qui ne saurait se combiner avec l'oxygène moléculaire sans une activation par le fer ou par d'autres métaux. Le très faible taux d'oxydation des produits purifiés ne serait pas dû à leur autoxydation, mais à la présence de traces de catalyseurs qui n'ont pu être éliminés.

Dixon et Tunnicliffe (96), reproduisant les expériences de Harrison, mais en utilisant le carmin d'indigo à la place du bleu de méthylène, trouvèrent des résultats parallèles et constatèrent que l'addition de traces infimes de chlorure ferrique produit une accélération marquée de la réduction.

Fabre et Simonnet (111) reconnurent également l'action catalytique des traces d'oxyde ferrique sur l'oxydation du glutathion, soit par l'oxygène de l'air (autoxydation), soit par les matières colorantes.

b) Cuivre.

L'action du cuivre a été étudiée parallèlement à celle du fer et, dans la plupart des essais, les résultats ont été comparables. Cependant, Elliot (100) a trouvé que le taux d'oxydation de la cystéine à pH 7,3 était proportionnel à la quantité de fer présente; pour le cuivre, il n'y aurait proportionnalité qu'au-dessous d'une certaine concentration du métal.

Elvehjem (101), peu après, arrivait aux mêmes conclusions : il retrouvait que l'activité maximum du cuivre dans les solutions tampons de phosphate contenant du pyrophosphate était obtenue à 20° et à pH 8. A ce pH, le taux de l'oxydation est directement proportionnel à la quantité de cuivre présente, à condition que cette quantité soit inférieure à 4×10^{-4} mg. Le taux de l'oxydation est augmenté en présence de pyrophosphate,

ce qui serait dû à la formation de pyrophosphate de cuivre, qui est plus soluble à pH 7,6 que le phosphate de cuivre et par conséquent plus actif catalytiquement.

Pour Vœgtlin, Johnson et Rosenthal (396), le cuivre est, de loin, le plus actif catalyseur de l'oxydation du glutathion; le fer, par contre, suivant ces auteurs, n'aurait aucune action catalytique. Ils émirent l'hypothèse suivante : de tous les métaux existant normalement dans l'organisme, tels que le fer, le manganèse, le cobalt, le nickel, le zinc... seul le cuivre est capable de catalyser la transformation : [glutathion réduit $\rightleftharpoons$ glutathion oxydé] qui est à la base de la respiration cellulaire; il doit donc exister entre le cuivre et le glutathion une relation physiologique intéressante. Quelques années auparavant, Vœgtlin, Johnson et Dyer (393) avaient déjà montré le rôle protecteur du glutathion vis-à-vis de l'action oligodynamique du cuivre sur les *Spyrogyres* et les têtards et vis-à-vis de l'action toxique du cuivre sur les Rats blancs. Le rôle catalytique de ce métal dans l'oxydation du glutathion expliquerait également l'observation de Rosenthal et Vœgtlin (348), montrant l'oxydation rapide du glutathion cristallisé ajouté au sérum sanguin; le sérum sanguin contient, en effet, du cuivre en quantité suffisante pour permettre cette oxydation.

c) Autres métaux.

Abderhalden et Wertheimer (1) avaient déjà remarqué qu'alors que le cuivre, le mercure et l'arsenic accélèrent l'oxydation de la cystéine, le plomb, le nickel, le cobalt, l'uranium, le thallium, le cadmium l'inhibent.

Vœgtlin, Johnson et Rosenthal (396) ont recherché systématiquement les corps susceptibles d'exercer une action catalytique vis-à-vis de l'oxydation du glutathion; ils trouvèrent que le cuivre, le sélénium, le tellure, le palladium, l'or, le cobalt accélèrent l'oxydation, que le fer, le manganèse, le nickel, l'étain, le plomb, l'arsenic, le cérium, l'osmium, le mercure, le platine, le chrome n'avaient aucune action et enfin que l'argent, le zinc, le cadmium, le bismuth, l'antimoine inhibaient plus ou moins l'oxydation. Ces auteurs opéraient en milieu tampon de pH 7,27. Pirie (325) peu après montrait que

l'argent, l'arsenic, le bismuth, le cobalt, le chrome, le mercure, le manganèse, le nickel, le plomb, l'uranium, le zinc n'avaient, en solution acide, qu'une action très faible ou même nulle.

3. Influence du disulfure.

En 1923, Dixon et Tunnicliffe (95) trouvaient que l'oxydation de la cystéine était catalysée par la cystine, probablement grâce à la formation d'un complexe intermédiaire cystéine-cystine; d'une manière plus générale, ils montraient que l'oxydation aérobie ou anaérobie d'un composé sulfhydrylé était accélérée par l'addition d'un disulfure (forme oxydée), que ce soit le disulfure correspondant au composé employé ou le disulfure d'un dérivé sulfhydrylé quelconque. La première idée qui vint à Warburg et Sakuma (406), puis à Harrison (157), est que cette action du disulfure pouvait être due à l'action catalytique de traces de métaux présentes dans le disulfure ajouté, plutôt qu'au disulfure lui-même.

Oppenheimer (319) partagea cet avis et pensa qu'une part de l'action catalytique observée par Dixon et Tunnicliffe pouvait être imputable à la présence de fer. Toutefois Harrison (157) estima devoir vérifier ces hypothèses et fit des expériences qui montrèrent que l'effet catalytique produit à la fois dans l'oxydation aérobie et dans l'oxydation anaérobie des dérivés sulfhydrylés, par l'addition de disulfure, n'était pas dû à des impuretés apportées par le disulfure, mais était une propriété réelle du disulfure lui-même.

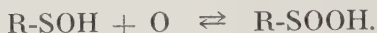
Dixon et Tunnicliffe (95) pensaient qu'il se formait un composé d'addition entre le dérivé sulfhydrylé et le disulfure et que ce complexe s'oxydait plus rapidement que le dérivé sulfhydrylé lui-même. Michaelis et Barron (304), à la suite d'une étude détaillée des complexes métalliques de la cystéine, ont montré, en particulier, que la cystine donnait, en l'absence d'oxygène, un complexe avec la cystéine cobalteuse, ce qui pouvait être rapproché de l'hypothèse faite par Dixon et Tunnicliffe, formation d'un composé d'addition des formes thiol et disulfure.

Pour Harrison (157), le mécanisme suivant se produirait :

1° Le disulfure, en solution, est pour une faible part hydrolysé en un mélange de dérivé sulfhydrylé correspondant et d'acide sulfénique :



2° L'acide sulfénique avec l'oxygène donne l'acide sulfinique :



3° Si un dérivé sulfhydrylé est présent, il réduit l'acide sulfinique :



Le dérivé sulfhydrylé est donc oxydé en disulfure et l'acide sulfénique est régénéré.

Si l'oxydation de l'acide sulfénique en acide sulfinique et la réduction de ce dernier par le dérivé sulfhydrylé ont lieu plus rapidement que l'oxydation directe du dérivé sulfhydrylé par l'air — et les expériences ont montré que cette dernière réaction en l'absence de métal était très lente — on a bien une action catalytique par addition de disulfure.

Dans le cas de l'oxydation anaérobie des dérivés sulfhydrylés où le bleu de méthylène remplace l'oxygène, l'action catalytique du disulfure peut être expliquée de la même façon :

L'action réversible :



peut être substituée à la réaction 2° citée plus haut.

Si l'action catalytique du disulfure se produit par le mécanisme décrit, dans lequel le premier stade invoque l'hydrolyse du disulfure, on peut penser que l'augmentation du pH de la solution doit aboutir à une augmentation du pouvoir catalytique du disulfure, l'hydrolyse ayant lieu avec une extension plus grande en solution alcaline.

4. Influence de quelques composés inhibiteurs d'oxydation.

Mathews et Walker (293) avaient déjà montré que l'oxydation des dérivés sulfhydrylés était inhibée par les cyanures et les nitriles, une molécule d'acide cyanhydrique suffisant pour arrêter l'oxydation de mille molécules de cystéine.

Cette action inhibitrice des cyanures a été retrouvée par tous les auteurs qui ont étudié les phénomènes d'oxydation des dérivés sulfhydrylés.

Mauthner (295) trouva que la cystine pouvait être réduite par une solution aqueuse de cyanure de potassium. Warburg et Sakuma (406) attribuèrent l'inactivation par le cyanure à la formation du complexe cystéine-fer-cyanure qui ne peut être oxydé par l'oxygène moléculaire. Abderhalden et Wertheimer (1) ayant préparé des échantillons de cystéine exempts de fer, dont l'oxydation était susceptible d'être inhibée par de petites quantités de cyanure, rejetèrent l'explication de Warburg et Sakuma et é mirent l'hypothèse que l'action inhibitrice des cyanures était due à leur action réductrice sur la cystine, prévenant, de cette façon, la formation d'un complexe autocatalytique cystéine-cystine. Harrison (159) pensa que la cystéine d'Abderhalden et Wertheimer contenait des traces de métaux qui n'avaient pas pu être éliminés et il soutint l'hypothèse de Warburg et Sakuma. Meyerhof (302) avait montré que l'inhibition du cyanure vis-à-vis de l'action catalytique du cuivre sur l'oxydation de l'acide thioglycolique était due à la formation d'un composé inactif avec le cuivre présent, l'action du cyanure sur le fer pouvant être analogue.

Warburg (406) observa que le pyrophosphate de sodium qui, comme les cyanures peut donner des complexes avec le fer, inhibe aussi l'oxydation de la cystéine et, de plus, il trouva que le pyrophosphate inhibait complètement l'activité catalytique du fer et du manganèse, mais n'affectait pas l'action du cuivre. Harrison devait étendre cette action inhibitrice du pyrophosphate de sodium au glutathion.

5. Influence de la lumière et de la température.

La lumière solaire accélère la réduction du bleu de méthylène par le glutathion. Morel et Delore (310), d'autre part, ont montré que l'autoxydation de glutathion réduit était inhibée par frigorification.

Pour conserver le glutathion, on devra donc se placer dans les conditions optima suivantes : pH < 5, absence de traces de métaux catalytiques, obscurité et basse température.

B. — MECANISME DE L'OXYDO-REDUCTION DES DERIVES SULFHYDRYLES.

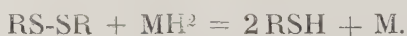
De nombreuses théories ont été élaborées pour expliquer l'oxydo-réduction des dérivés sulfhydrylés. Hopkins (182) exprima tout d'abord le mécanisme de l'oxydation par l'équation :



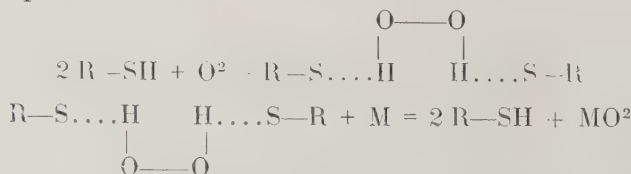
En présence d'une molécule M oxydable, on aurait :



ou en l'absence d'eau :



Ceci serait en accord avec la théorie de Hoppe Seyler, reprise par Wieland (408) selon laquelle, dans une oxydo-réduction, l'élément mobile est l'hydrogène. Meyerhof (301) admet la formation d'un peroxyde très actif capable d'oxyder des substances importantes dans la respiration cellulaire.



Thurlow (369) par assimilation avec ce qui se passe dans le cas des autres systèmes d'oxydation, et quoique

il n'ait pas pu mettre en évidence, dans le cas du glutathion, la formation d'eau oxygénée, considère cette formation comme probable. En anaérobiose, on aurait :



En aérobiose :



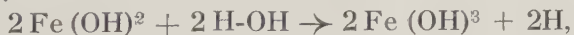
D'après Kendall et Nord (223), la cystéine et le glutathion réduit sont, en l'absence d'oxygène, incapables de réduire le carmin d'indigo, mais en présence de petites quantités d'oxygène, il se forme un composé d'addition de l'oxygène avec le dérivé sulfhydrylé, grâce auquel le système acquiert le pouvoir de réduire les colorants. La même activation serait obtenue par addition de H_2O^2 .

Mais Dixon et Tunnicliffe (96) n'admirent pas ces conclusions et discutèrent point par point les expériences de Kendall et Nord; ils trouvèrent que la cystéine et le glutathion pouvaient réduire le carmin d'indigo en l'absence d'oxygène et que la formation d'un complexe $\text{O} + \text{RSH}$ n'était pas nécessaire.

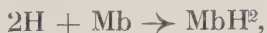
Nous avons vu que de nombreux auteurs prêtaient au fer un rôle important dans l'oxydation des dérivés sulfhydrylés. Le fer agirait comme catalyseur intermédiaire, alternativement oxydé et réduit. L'ion ferrique est réduit par le composé sulfhydrylé :



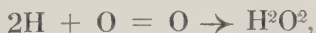
le composé ferreux ainsi formé, réduit un accepteur, tel que le bleu de méthylène, l'oxygène ou même un peroxyde :



avec le bleu de méthylène :



et avec l'oxygène :



le composé ferrique est réduit à son tour, et ainsi de suite.

Hopkins et Dixon (176) avaient montré que la substance amorphe, légèrement impure, obtenue, lors des premiers essais d'extraction du glutathion, catalysait l'oxydation des protides dans une préparation musculaire thermostable. Ajoutée au tissu épuisé par l'eau, elle restituait au système sa capacité d'absorber l'oxygène et catalysait, *in vitro*, à l'état de traces, l'oxydation des acides gras non saturés, qu'ils soient à l'état d'éthers de la glycérine ou engagés dans des combinaisons telles que les lécithines.

Renouvelant ces essais, en utilisant du glutathion pur cristallisé, Dixon et Meldrum (94) ont observé que ce corps n'est pas autoxydable, l'addition de sels de fer ou de cuivre ou celle d'hématine ne rétablit pas l'oxydation ; mais des traces de glutathion impur peuvent réactiver le produit pur. Le pouvoir autoxydateur du glutathion dépendrait donc de la présence simultanée de métaux catalytiques et d'un facteur additionnel qui serait pour Meldrum et Dixon la cystéine, alors que pour Mason cette substance jouant un rôle catalytique serait la cystéinyl-glycine. En 1929, Hopkins (184) avait montré qu'une solution aqueuse de glutathion, portée à l'ébullition, subissait une décomposition et parmi les produits ainsi obtenus, il notait la présence d'acide pyrrolidone-carboxylique et de l'anhydride de la cystéinyl-glycine. Mason (292) remarqua que cette décomposition se produisait déjà à 37°. La substance isolée donnait, avec le réactif de Sullivan pour la cystéine, une coloration rouge pourpre nettement distincte de celle donnée par la cystéine ; la différence cependant n'est plus nette si on effectue la réaction sur de très petites quantités de substance. La cystéinyl-glycine, produit de la décomposition du glutathion, donnant une réaction voisine de celle de la cystéine, expliquerait que Meldrum et Dixon (298) aient trouvé que le glutathion, après un séjour de 12 heures à 40°, contenait de la cystéine, ce qui les conduisit à prêter à ce corps un rôle primordial dans l'autoxydation du glutathion impur, alors que ce rôle serait tenu par la cystéinyl-glycine, d'après Mason.

S'appuyant sur les faits observés *in vitro*, Meldrum et Dixon ont tenté d'expliquer le mécanisme de l'oxydation

du glutathion dans les tissus. On peut considérer diverses possibilités; l'autoxydation peut être catalysée par le complexe ferro-cystéine ou par un complexe similaire; elle peut être catalysée par l'hématine; l'oxydation peut encore avoir lieu au moyen du cytochrome ou de l'eau oxygénée, soit directement, soit indirectement, comme Szent-Györgyi (364) l'avait suggéré.

En ce qui concerne l'hématine, Harrison (157) a observé que si elle était capable, par son fer, de catalyser ces oxydations, il ne semble pas qu'en réalité, on puisse attribuer à cette substance un rôle primordial. D'après Meldrum et Dixon (298), en effet, les tissus ne contiennent pas des quantités d'hématine suffisantes pour catalyser la réaction, ces auteurs ayant montré que de petites quantités de ce corps n'affectaient pas l'autoxydation. D'ailleurs le fer est peut-être plus actif dans les corps minéraux que dans les composés organiques.

Quant à l'intervention du cytochrome, Keilin (217), en 1930, a effectivement montré que la cystéine était rapidement oxydée par le cytochrome (indophénoloxydase) et on pouvait penser que pour le glutathion, un mécanisme comparable aurait pu intervenir; mais Keilin (217) a montré que le glutathion, contrairement à la cystéine, n'était pas oxydé par le cytochrome. Szent-Györgyi ayant lui-même abandonné l'idée de l'intervention du peroxyde, Meldrum et Dixon (298) conclurent à la probabilité de l'intervention d'un complexe ferro-cystéine.

Un fait cependant est à l'encontre de cette hypothèse, c'est que la cystéine n'existe pas dans l'organisme en quantité suffisante pour permettre l'oxydation.

Il est probable que le mécanisme qui préside à l'oxydo-réduction des tissus est infiniment complexe et que de nombreux facteurs interviennent. Mais il est hors de doute que le glutathion, de par sa structure, joue le rôle important de transporteur d'hydrogène et de tampon du rH^2 tissulaire.

CHAPITRE IV

**CARACTÉRISATION ET DOSAGE
DU GLUTATHION**

Réactions caractéristiques du glutathion

Les réactions de caractérisation du glutathion sont celles des dérivés sulfhydrylés; elles ne sont donc pas spécifiques et toutes sont, en particulier, données également par la cystéine. Pour caractériser le glutathion, il faut donc rechercher la présence du groupement sulfhydrylé et voir, ensuite, si la réaction obtenue n'est pas due à un dérivé à groupe (—SH), autre que le glutathion.

A. — REACTIONS DES DERIVES SULFHYDRYLES.

1. Réaction fondée sur l'action du soufre.

Le glutathion est capable d'hydrogéner le soufre à froid, en donnant de l'hydrogène sulfuré. Cette réaction qui attira l'attention de Rey-Pailhade (338) sur les dérivés sulfhydrylés, s'effectue fort bien dans les conditions indiquées par cet auteur, dès 1888. Si, à une solution de glutathion, on ajoute du soufre, préalablement humecté d'alcool, on obtient un dégagement d'hydrogène sulfuré, qu'on peut mettre en évidence par le noircissement d'un papier à l'acétate de plomb, introduit dans le tube où l'on opère.

2. Réaction fondée sur la formation de sulfure de plomb.

Le glutathion donne du sulfure de plomb noir, par ébullition avec une solution alcaline de sel de plomb. On peut utiliser le plombite de soude qui se prépare en chauffant dans une capsule de porcelaine, jusqu'à clarification complète :

10 cm³ de sous-acétate de plomb,
50 cm³ d'eau,
50 cm³ de lessive des savonniers.

On peut également ajouter à la solution de glutathion un demi-volume de lessive de soude, porter à l'ébullition, et ajouter deux ou trois gouttes de sous-acétate de plomb. Après agitation et nouveau chauffage, le mélange se colore en noir.

3. Réaction au nitroprussiate.

La réaction au nitroprussiate avait été utilisée dès 1901 par Mörner pour l'identification de la cystéine. Elle fut employée ensuite par de nombreux auteurs. Heffter (161), en 1908, vit que non seulement la cystéine, mais également l'éthyl et le benzylmercaptan, l'acide thioglycolique, les acides α et β thiolactiques, le thiophénol..., donnaient une coloration rouge pourpre avec le nitroprussiate de soude en milieu alcalin. L'hydrogène sulfuré dans les mêmes conditions, donne une coloration plus violette.

Heffter (161) avait d'ailleurs constaté que si dans la réaction on remplaçait l'ammoniaque par la soude, on obtenait une coloration rouge brique disparaissant rapidement ; après décoloration, si on ajoute de l'acide acétique et que l'on porte à l'ébullition, on obtient une coloration « bleu Berlin ».

Des corps ne possédant pas le groupement ($-\text{SH}$) peuvent aussi réagir en milieu alcalin avec le nitroprussiate. C'est ainsi que l'acétone préalablement acidifiée par l'acide acétique, donne une coloration rouge pourpre intense ; l'acide glycuronique en milieu sodique donne une coloration rouge, mais ne donne rien en

milieu ammoniacal. La créatinine, enfin, additionnée d'ammoniaque, puis de nitroprussiate de soude, donne une coloration rouge brique s'établissant progressivement.

Les conditions de la réaction ont été précisées par de nombreux auteurs. On ajoute à une solution de glutathion, ou, plus généralement, de corps possédant le groupement ($-SH$), quelques gouttes d'une solution récente de nitroprussiate de soude à 5 pour 100, puis d'alcali en excès ; on obtient une coloration rouge légèrement violacée.

Mme Randoin et René Fabre (334) apportèrent à cette réaction une amélioration augmentant sa sensibilité : dans un petit tube à essai, on met 0 cm^3_3 de solution de glutathion, on ajoute une goutte de solution de nitroprussiate à 5 pour 100 (préparée extemporanément) puis on fait arriver l'ammoniaque à la surface du mélange, au moyen d'une pipette finement effilée. On voit apparaître un anneau rouge au contact de l'ammoniaque. De cette manière, il est possible d'apprécier une teinte rose faible, la réaction étant encore sensible pour une concentration de 1 milligramme pour 100 cm^3 de liqueur.

Fleming (122) devait, lui aussi, proposer une méthode permettant d'obtenir une réaction positive avec des solutions très diluées de dérivés sulfhydrylés : à 2 cm^3 de la solution à essayer, il ajoute 0 cm^3_5 d'une solution récente de nitroprussiate de soude à 1 pour 100 et des cristaux de chlorure de sodium en quantité suffisante pour atteindre la saturation, de façon qu'il reste au fond du tube à essai, une petite couche de chlorure de sodium non dissous ; on ajoute alors trois gouttes d'une solution normale d'ammoniaque.

Nous avons essayé ce procédé, mais il s'est montré d'une sensibilité beaucoup moins grande que celui de Mme Randoin et René Fabre, aussi, est-ce la technique de ces derniers auteurs que nous avons toujours employée.

Zimmet (419) modifia la réaction de façon à pouvoir caractériser le glutathion en présence d'acétone. Il utilisa le réactif suivant :

Nitroprussiate de soude	5 g.
Phosphite de soude	50 g.
Eau distillée	100 cm ³

au moyen duquel une solution d'acétone, même concentrée, ne donne pas de coloration rose ou rouge, même après plusieurs heures; par contre, 1 cm³ d'une solution de glutathion à 1 pour 10.000, en milieu neutre ou légèrement acide, donne la réaction rubis caractéristique. De plus, ce réactif donnerait une réaction moins fugace que celle fournie par le nitroprussiate ammoniacal et se conserverait dans un flacon bouché sans altération.

Ces réactions étant dues à la présence du groupement (—SH) ne sont données que par les formes réduites, à l'exclusion des formes oxydées. Walker (404) étendit la réaction nitroprussique aux disulfures, en substituant à l'alcali, une solution à 10 pour 100 de cyanure alcalin. Si la solution de disulfure est très concentrée, la couleur se développe instantanément, si la concentration est faible (1 pour 1.000), le temps nécessaire pour obtenir une intensité maximum est de vingt minutes. Une solution à 1 pour 10.000 demande un délai plus long encore et la solution est seulement rose pâle. Cette concentration représenterait, pour Walker, la limite de sensibilité. Le cyanure transforme vraisemblablement le groupement (—S—S—) en (—SH), et cette réduction ayant eu lieu, on peut avoir la réaction habituelle avec le nitroprussiate. Mauthner (295), dès 1912, avait montré que la cystine était réduite en cystéine par une solution aqueuse de cyanure de potassium.

La réaction au nitroprussiate a été utilisée par de nombreux auteurs pour la caractérisation microchimique du glutathion. Heffter (162), Arnold (9), Gola (144), l'employèrent pour mettre en évidence les dérivés sulfhydrylés dans les tissus. Fauré-Frémiet et Dragoiu (114) l'utilisèrent pour rechercher si le composé sulfuré de la cellule épithéliale granuleuse du poumon était du glutathion réduit.

Joyet-Lavergne (210) donna, en 1928, un procédé de recherche microscopique du glutathion dans les cellules fondé sur cette réaction. Pour l'étude des tissus frais, il utilisait, soit une méthode directe par le nitroprussiate

ammoniacal, soit une méthode indirecte où la réaction au nitroprussiate est précédée de l'action d'un corps qui renforce la réaction colorante : solution aqueuse de sulfite de sodium, ou de sulfate d'ammonium. Pour l'étude des tissus fixés, il utilisait l'un des trois fixateurs suivants : solution d'acide trichloracétique, formol salé, alcool absolu, et il opérait la réaction au nitroprussiate comme pour les tissus frais. Giroud et Bulliard (142) tentèrent de stabiliser la réaction au nitroprussiate, ils y parvinrent en faisant intervenir un sel de zinc grâce auquel la coloration pourpre habituelle est remplacée par une coloration rouge groseille stable.

Pour la mise en évidence des ($-SH$) fixes des tissus, ces auteurs emploient la technique suivante :

Les organes sont coupés au microtome à congélation. Les coupes sont immergées, quelques secondes, dans l'acétate de zinc à 5 pour 100, et après un rapide rinçage à l'eau distillée, sont traitées par le nitroprussiate, elles sont ensuite passées à l'alcool, puis au toluène et incluses dans le baume. Les préparations restent colorées longtemps ; toutefois, il est préférable de les conserver à la glacière.

La créatinine, l'acétone, qui agissent habituellement sur le nitroprussiate, ne donnent pas de coloration en présence de sel de zinc.

4. Réaction de Feigl (115).

Cet auteur a mis au point un mode de diagnose des dérivés sulfhydrylés qui repose sur le fait que le groupe ($-SH$) catalyse la réaction :



On opère de la façon suivante : à la solution de dérivés sulfhydrylés, on ajoute environ 0 g. 10 d'azothydrate de sodium et la même quantité d'iodure de sodium, finement pulvérisé. On agite, puis on additionne le mélange de 1 à 2 cm³ de solution d'iode N/10. On obtient alors un dégagement immédiat d'azote, qu'on peut facilement mettre en évidence, même s'il n'existe qu'en très petites

quantités. Si on opère la réaction sur un filtrat sanguin trochloracétique, la solution doit être préalablement ajustée à l'aide de carbonate de sodium à un pH d'environ 6.

5. Réaction phosphotungstique.

La cystéine et le glutathion réduit, donnent avec le réactif de Folin et Wu, en milieu alcalin, une coloration bleue. Cette réaction qui avait été appliquée initialement par Folin et Looney (127) au dosage colorimétrique de la cystéine, a été étendue par Hunter et Eagles (192) au glutathion réduit. L'acide urique donne une réaction identique.

6. Réaction phosphomolybdique.

Les dérivés sulfhydrylés donnent, avec le réactif phosphomolybdique additionné d'une petite quantité de sulfate de cuivre, une coloration bleue. L'ion cuivrique est réduit presque instantanément à froid, par le glutathion, ainsi que nous l'avions du reste constaté, lors des essais effectués pour la préparation de ce composé. Le réactif phosphomolybdique est réduit à son tour, en donnant la coloration caractéristique.

7. Réaction arsénophosphotungstique.

Le glutathion réduit le réactif arsénophosphotungstique utilisé par Benedict (18), pour le dosage de l'acide urique, en donnant une coloration bleue.

B. — DIFFERENCIATION DE LA CYSTEINE.

Les réactions que nous venons d'examiner, ne permettent pas de différencier le glutathion des autres dérivés sulfhydrylés et en particulier de la cystéine. Plusieurs auteurs ayant donné des réactions spécifiques de la cystéine, on peut ainsi caractériser le glutathion par exclusion.

La première en date de ces réactions, permettant de différencier la cystéine du glutathion, est due à Sulli-

van (361). La cystéine, en effet, donne une coloration rouge, avec le 1-2 naphtoquinone-4-sulfonate de sodium, en milieu alcalin et en présence de sulfite de sodium. La cystine ne donne pas cette réaction, sauf si on la traite préalablement, par le cyanure de sodium, ce qui revient à la réduire à l'état de cystéine. Quant au glutathion, il ne donne cette réaction, ni sous sa forme réduite, ni sous sa forme oxydée. Hunter et Eagles (192) précisèrent la réaction de Sullivan (361). Ils utilisèrent le β -naphtoquinone-4-sulfonate de sodium préparé à partir de l'acide 1-amino-2-naphto-4-sulfonique suivant la méthode de Folin (125). Ils constatèrent, d'autre part, que certains acides aminés donnaient une réaction voisine, mais que la teinte obtenue n'était cependant pas identique à celle donnée par la cystéine.

La difficulté d'obtention du réactif à la naphtoquinone a conduit Fleming (122) à rechercher un test plus simple. Il constata que le chlorhydrate de cystéine réagissait avec le chlorhydrate de diméthyl-p-phénylène-diamine, en chauffant en présence de perchlorure de fer, pour donner une coloration bleu foncé stable. Cette réaction serait négative, avec les sulfures, la cystine, les acides thiolactique, thioglycolique et le glutathion.

Elizabeth Dyer et Baudisch (99) observèrent qu'une solution aqueuse de chlorhydrate de cystéine, agitée avec une solution chloroformique de o-benzoquinone, donnait, après repos, une coloration rouge de la couche chloroformique. Cette réaction qui, pour ces auteurs, serait aussi spécifique que celle de Sullivan (361), a été étudiée par Hess et Sullivan (167) qui trouvèrent que des substances diverses, telles que benzidine, aniline, triméthylamine, acétonitrile... donnaient une coloration rouge comparable.

Pratiquement, le sang et les tissus ne renferment pas de cystéine et les autres composés sulfhydrylés n'y étant présents qu'en très faible proportion, on donne souvent comme caractérisant le glutathion, la réaction au nitroprussiate.

II

Dosage du glutathion sous la forme réduite

A. — EXPOSE CRITIQUE DES DIVERSES METHODES PROPOSEES.

Si, grâce à son groupement sulfhydrylé, le glutathion réduit est facilement mis en évidence dans les tissus animaux et végétaux, sa détermination quantitative ne fut entreprise qu'en 1925, date à laquelle Tunnicliffe (373) publia une méthode de dosage.

Jusqu'alors on s'était contenté des valeurs fondées sur les quantités de dérivés sulfhydrylés qu'Hopkins (178) était parvenu, en 1921, à isoler soit de la levure, soit des muscles et du foie des mammifères. Elles ne correspondaient nullement à la réalité, la méthode employée alors ne donnant que des rendements insignifiants : 0 g. 10 à 0 g. 15 de dérivés sulfhydrylés par kilog de levure, soit 0,01 à 0,015 p. 100 grammes. Le taux dans le muscle était tenu pour comparable et le foie semblait être plus riche.

Abderhalden et Wertheimer (1), en 1923, avaient estimé colorimétriquement la substance réagissant avec le nitroprussiate de sodium dans le muscle de cheval. Ils l'évaluèrent en cystéine et ils obtinrent 10 mg. par 100 grammes ; évalué à l'état de glutathion, ce pourcentage est de 20 mg.

A la même époque, Tunnicliffe (372) avait indiqué une méthode volumétrique de dosage des dérivés sulfhydrylés, consistant essentiellement à mesurer l'absorption de l'oxygène, dans des conditions déterminées de réaction

et de température, dans un appareil du type manomètre différentiel de Barcroft. Il avait proposé également une méthode basée sur la décoloration du bleu de méthylène qui était une adaptation de la méthode de Thunberg. Recherchant toujours un mode d'appréciation quantitative des dérivés sulphydrylés, Tunnicliffe, en collaboration avec Dixon, montra que le dosage iodométrique permettait de doser le glutathion dans ses solutions. Ce fut cette publication qui permit à l'étude biologique et physiologique du glutathion de prendre tout son essor.

Le dosage par l'iode, proposé par Tunnicliffe (373), fut employé par de nombreux auteurs et une grande partie des résultats indiqués dans les travaux concernant le glutathion ont été évalués à l'aide de cette méthode, dont voici la technique :

Un poids connu de tissu est broyé au mortier à l'aide de sable avec une solution à 10 p. 100 d'acide trichloracétique. Le mélange obtenu est filtré sur entonnoir de Büchner et le résidu est traité deux fois par une nouvelle quantité de solution d'acide trichloracétique. Cette extraction paraît suffisante, car la réaction au nitroprussiate de sodium est négative si on l'effectue sur une liqueur provenant d'un quatrième épuisement.

Le filtrat limpide obtenu est titré avec une solution centinormale d'iode, en employant le nitroprussiate de sodium comme indicateur externe. On a la réaction :



Un centimètre cube de solution centinormale d'iode correspond à 3 mg. 07 de glutathion réduit. (Notons ici que les résultats donnés par de nombreux auteurs ont été calculés en considérant le glutathion comme un dipeptide de poids moléculaire égal à 250.)

Pour la levure de bière, Tunnicliffe (373) recommande de la triturer avec de l'acide trichloracétique, de porter le tout à une température de 60°, de filtrer après refroidissement et d'effectuer sur le filtrat limpide le dosage du glutathion.

Tunnicliffe (373) vérifia la spécificité de cette méthode. Dans les extraits de tissus, diverses substances : urée, acide urique, créatinine, glucose, fructose réagissent sur

l'iode, mais n'interfèrent pas avec le glutathion dans le dosage iodométrique, le nitroprussiate de sodium étant employé comme indicateur externe. D'autre part, des évaluations dans les extraits de tissus, du soufre à l'état de sulfate et du soufre total ont donné des taux tels que la différence, qui correspond au soufre soluble organique, était en parfaite concordance avec le soufre présent dans les groupements ($-SH$) évalués par la méthode iodométrique.

Depuis la publication de cette méthode par Tunnicliffe, de nombreux auteurs ont mis au point des modes de dosages utilisant pour la plupart, sinon tous, le pouvoir réducteur du glutathion. Afin de pouvoir entreprendre la discussion de ces diverses méthodes, nous les passerons en revue après les avoir classées arbitrairement en deux groupes; le premier comprenant les méthodes iodométriques, modifications du procédé de Tunnicliffe; le second étant constitué par diverses méthodes colorimétriques.

1. Méthodes iodométriques.

Nous avons décrit en détail le procédé de Tunnicliffe (373), et on pourrait presque dire que chaque auteur l'ayant utilisé y a apporté une modification. Ceci tient vraisemblablement à deux causes : la première, c'est que cette méthode n'est peut-être pas pleinement satisfaisante; la seconde, c'est qu'étant délicate chaque exécutant y a apporté un tour de main qui lui est particulier. Ces deux ordres de faits se rejoignent du reste, car c'est le même point du dosage qui suscite les critiques, à la fois pour son manque de sensibilité et pour la complication apparente de son exécution. Toutes ces critiques visent en effet l'emploi du nitroprussiate de sodium comme indicateur externe.

L'utilisation dans les dosages volumétriques d'un indicateur externe a l'inconvénient d'exiger des prélèvements sur la liqueur à titrer, ce qui entraîne une erreur par défaut. On peut évidemment opérer un second dosage où, le chiffre approximatif étant connu, on n'a plus à effectuer qu'un ou deux essais, ce qui dimi-

nue considérablement l'erreur. Mais les dosages de glutathion sont souvent effectués dans des liquides biologiques dont on ne dispose qu'en volume très limité, ce qui ne permet pas un double dosage. Kennaway et Hieger (224) réduisent la quantité de liquide prélevé pour les essais avec le nitroprussiate à 2 à 3 p. 100 de la quantité totale; ils opèrent de la façon suivante : dans une série de petits tubes, ils mettent 2 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammoniaque, deux gouttes d'ammoniaque et cinq gouttes de solution à 1 p. 100 de nitroprussiate de sodium récemment préparée. Ils ajoutent dans la liqueur à titrer de l'iode centinormal jusqu'à ce que cinq à dix gouttes de la solution à titrer mises dans un de ces petits tubes ne provoquent plus de coloration pourpre.

Pincussen et Yokota (322) font des essais à la touche sur une plaque vitrifiée sur laquelle des petits tas d'un mélange de vingt parties de sulfate d'ammoniaque pour une partie de nitroprussiate de potassium ont été déposés; à chaque essai, une goutte de la liqueur est mise sur un des petits tas ainsi qu'une goutte d'ammoniaque. Vers la fin du dosage, lorsque la coloration est à peine perceptible, les auteurs utilisent un petit tube à essai, afin d'opérer sur une plus grande quantité de la liqueur à titrer et de mieux saisir la disparition de la coloration marquant la fin de la réaction.

Ce n'est pas encore le fait d'exiger des prélèvements répétés de liqueur, fait qui est commun à tous les dosages utilisant un indicateur externe, mais le choix de l'indicateur même qui a été surtout l'objet de nombreuses critiques. La principale et la plus grave réside dans le manque de sensibilité de la réaction; la limite de cette sensibilité correspond d'après Blanchetière et Mélon (50) à une solution de cystéine à 200 mg. par litre et à une solution de glutathion à 125 mg. par litre. Certains auteurs ont cherché à augmenter cette sensibilité; c'est ainsi que Mme Randoïn et René Fabre (334) précisèrent un mode opératoire qui, comme nous l'avons vu précédemment, permet d'obtenir une réaction encore sensible pour une concentration de 1 mg. par 100 cm³ de liqueur. Mais la plupart des auteurs rejetèrent abso-

lument l'emploi du nitroprussiate de sodium et effectuèrent le dosage iodométrique en présence d'empois d'amidon.

Thompson et Vœgtlin (367), dès 1926, avaient étudié comparativement le titrage iodométrique du glutathion en employant soit le nitroprussiate de sodium comme indicateur externe, soit l'empois d'amidon. Ils rejetèrent l'emploi de ce dernier, son manque de spécificité conduisant à des résultats trop élevés. Kennaway et Hieger (224) trouvèrent eux aussi des écarts importants entre les chiffres obtenus par l'une ou l'autre méthode. Bierich et Kalle (24) devaient arriver aux mêmes conclusions. Turner (375) établit également que les deux modes d'appréciation de la fin du titrage iodométrique n'étaient pas comparables, l'emploi de l'amidon donnant des chiffres de 5 à 15 p. 100 plus forts que le dosage par le nitroprussiate. Cependant, d'après Uyei (376), les taux obtenus par le dosage en présence d'amidon seraient satisfaisants, étant en concordance avec les chiffres donnés par l'analyse du soufre labile correspondant. Blanchetière et Mélon (50) adoptèrent l'empois d'amidon comme indicateur du terme de la réaction, la méthode au nitroprussiate conduisant, d'après ces auteurs, à des résultats trop faibles, par son manque de sensibilité. Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5) optèrent pour le dosage du glutathion par l'iode en présence d'amidon après avoir fait divers essais qui leur permirent de constater que le dosage de 1 mg. de glutathion peut s'effectuer avec une précision suffisante à l'aide d'une solution centinormale d'iode; mais ils ne démontrèrent pas que le dosage en présence d'amidon, dans les liquides biologiques, donnait des chiffres correspondant uniquement à la valeur du glutathion ou tout au moins au taux des dérivés sulphydrylés.

Il est difficile d'affirmer qu'un mode d'appréciation du terme de la réaction est seul satisfaisant à l'exclusion de l'autre; aussi nous paraît-il judicieux d'opérer ainsi que Mme Randoin et René Fabre (334) l'ont préconisé : lorsque la réaction au nitroprussiate est devenue négative, ils ajoutent à la liqueur de 1 à 2 cm³ de réactif de Tromsdorff à l'empois d'amidon et continuent

à verser la solution centinormale d'iode jusqu'à obtention d'une teinte bleue stable. On détermine ainsi deux chiffres qu'il est bon de noter, leur écart pouvant en lui-même être intéressant. Nous avons pu, grâce à l'emploi systématique de ce mode opératoire, constater, lors de l'extraction du glutathion de la levure de bière, qu'au fur et à mesure que nous avançons dans les divers stades de la préparation, les liqueurs devenant plus pures, cet écart diminuait, pour s'annuler avec les solutions de glutathion pur.

Voici, par exemple, les chiffres obtenus au cours d'une préparation de glutathion. Les dosages ont été effectués, à tous les stades, selon la méthode de Mme Randoin et René Fabre. Nous avons ainsi déterminé les valeurs de :

G = nombre de mg. de glutathion réduit pour 100 g. de levure (obtenu par la réaction au nitroprussiate);

G' = nombre de mg. de glutathion réduit pour 100 g. de levure (obtenu par la réaction à l'empois d'amidon);

et A ou rapport $\frac{G'}{G}$:

	G	G'	A = $\frac{G'}{G}$
1. Première liqueur d'extraction de la levure...	502,87	670,49	1,33
2. Liqueur obtenue après décomposition du sel de Plomb, par l'acide sulfurique.	500,03	595,61	1,19
3. Liqueur obtenue après décomposition du sel cuivreux par l'hydrogène sulfuré.	421,76	432,28	1,02
4. Solution du produit pur cristallisé	413,25	413,25	1

Lors de nos premiers essais d'obtention du glutathion, nous avons une partie de la liqueur mère qui devenait sirupeuse et cristallisait mal. Nous avons repris ces divers résidus et nous avons effectué des recrystallisations successives, afin d'obtenir un produit pur, convenablement cristallisé. Voici les valeurs de G, de G' et de A, obtenues au cours de ces diverses recrystallisations, et qui correspondent à la totalité du produit impur que nous possédions.

	G	G'	$A = \frac{G'}{G}$
Liqueur primitive	5.083 mg. 92	5.968 mg. 08	1,17
Solution du produit de première cristallisation	5.061 mg. 14	5.612 mg. 63	1,10
Solution du produit de seconde recrystallisation	5.046 mg.	5.319 mg. 26	1,05
Solution du produit de troisième recrystallisation	5.035 mg. 19	5.087 mg. 45	1,01
Solution du produit pur	4.088 mg. 33	4.088 mg. 33	1

Nous voyons donc nettement, par ces tableaux, que si, dans les solutions impures de glutathion, l'écart est important entre la valeur obtenue par la méthode à l'empois d'amidon et l'essai au nitroprussiate, cet écart s'annule lorsque les solutions sont pures, le rapport $\frac{G'}{G}$

— devenant égal à 1.

G

Ces constatations nous permettent de conclure que, dans les filtrats de levure, la méthode iodométrique, en présence d'amidon, donne des chiffres englobant le glutathion et diverses substances réductrices présentes dans la levure.

Ceci mis à part en dehors de toute discussion sur la plus ou moins grande spécificité du titrage iodométrique

avec l'empois d'amidon, d'autres critiques ont été formulées qui visent en particulier l'appréciation délicate de la fin de la réaction. Si ce terme est très facilement appréciable dans les solutions aqueuses de glutathion, il en est tout autrement lorsqu'on opère soit dans des filtrats sanguins, soit dans des extraits de tissus ou même de levure. La coloration obtenue n'est plus bleue, mais tire sur le mauve et, de plus, elle persiste un temps variable avec l'extrait envisagé et avec la quantité d'iode en excès ajoutée. Perlzweig et Delrue (321) essayèrent de remédier à cet inconvénient et firent le raisonnement suivant : pour doser le glutathion dans les liquides biologiques, on emploie généralement de l'iode centinormal ou même plus dilué. La solution centinormale obtenue par dilution d'une solution décijnormale, renfermant généralement 25 grammes d'iodure de potassium par litre, n'en contient plus qu'une quantité insuffisante pour l'obtention d'une coloration bleue relativement permanente avec l'amidon. L'absence d'iodure de potassium étant, pour ces auteurs, la cause du manque de netteté du virage de l'empois d'amidon, ils ajoutent au moment de titrage 2 cm³ environ de solution d'iodure de potassium à 25 p. 100 à l'extrait trichloracétique. L'absence d'iodure de potassium ne paraît pas être la cause unique de la difficulté d'appréciation du terme de la réaction dans les liquides biologiques, car elle n'explique pas que cette difficulté disparaît lorsqu'on opère sur des solutions de glutathion pur et qu'elle varie très sensiblement selon les extraits d'organes envisagés.

Gavrilescu (136) se rallia à l'idée de Perlzweig et Delrue (321), mais trouva que si l'iodure de potassium stabilisait le point final, il était toutefois nécessaire de tenir compte de l'acidité. Cet auteur entreprit une étude comparative du titrage iodométrique du glutathion en employant pour déterminer le terme de la réaction : a) l'amidon dans les filtrats acides habituellement utilisés (acide trichloracétique à 10 p. 100; b) l'amidon dans les filtrats acides additionnés de 2 cm³ d'iodure de potassium à 25 p. 100; c) l'amidon dans les solutions neutralisées au tournesol, puis additionnées d'iodure de potassium. Il compara les résultats obtenus au dosage iodo-

métrique avec le nitroprussiate de sodium comme indicateur externe, ce mode de dosage étant à son avis plus précis, et l'inconvénient de son emploi résidant uniquement dans l'appréciation délicate de la faible teinte précédant l'absence de coloration. Gavrilesco (136) constata que le premier mode d'appréciation du terme de la réaction donnait des résultats beaucoup trop élevés, alors que le second donnait des chiffres trop faibles. Seul le troisième mode donnait des taux comparables à ceux obtenus avec le nitroprussiate. Il proposa donc d'utiliser l'empois d'amidon dans des filtrats préalablement neutralisés et additionnés d'iodure de potassium.

L'addition d'iodure de potassium à la liqueur à titrer ne fut pas la seule modification apportée par Perlzweig et Delrue (321) à la méthode de Tunnicliffe (373). La disparition, par addition d'hyposulfite de sodium, de la coloration bleue d'une solution contenant un excès d'iode apparaissant comme plus sensible que l'apparition de cette coloration, ces auteurs ajoutèrent un excès d'iode et firent un dosage en retour en utilisant une solution d'hyposulfite de sodium de même titre. King, Baumgartner et Page (226) utilisèrent le titrage en retour, mais sans ajouter d'iodure à leur liqueur à titrer. Quant à Kühnau (234), sa méthode ne diffère pas, dans ses grandes lignes, de celle de Perlzweig et Delrue (321).

Il n'en est pas de même, du moins en apparence, de celle que Gabbe (131) proposa au XXX^e Congrès International de Physiologie. Elle comprend aussi un dosage par l'iode dans lequel l'iode est ajouté en excès, l'excès étant titré en retour par une solution d'hyposulfite. La nouveauté consiste essentiellement à traiter le glutathion par un excès de ferricyanure de potassium en solution chlorhydrique; l'excès de ferricyanure réagit alors sur de l'iodure de potassium ajouté, et l'iode ainsi libéré est titré par l'hyposulfite. Le glutathion réduit n'est pas oxydé par le ferricyanure en solution chlorhydrique d'un titre inférieur à la centinormalité. En conséquence, l'oxydation du glutathion n'a pas lieu tant que l'iode n'est pas libéré. Cette méthode ne paraît donc pas avoir d'avantages sur les titrages iodométriques en retour habituels.

Or, Chang et Ling (70) montrèrent l'inconvénient des dosages en retour. Delaville et Kowarski (84) constatèrent que le titrage en retour du glutathion donnait des résultats beaucoup plus forts que le dosage direct et que, d'autre part, ce résultat était d'autant plus fort que le contact de la solution avec l'iode avait été plus prolongé, ce qui rendait impossible l'obtention d'une valeur stable. Kühnau (234) s'est mis en partie à l'abri de cette dernière critique en fixant étroitement les différents temps de son dosage.

Malgré tout, le dosage en retour apparaît « inadmissible », ainsi que Delaville et Kowarski (85) l'ont déclaré. Mlle Wurmser (416) l'utilise cependant pour le dosage du glutathion dans les produits opothérapiques, l'emploi d'amidon passant avec ces produits par une gamme de couleurs instables rendant le virage impossible à saisir. Les chiffres de cet auteur ont ceci d'intéressant qu'ils apportent, à notre avis, un argument décisif à l'encontre de l'utilisation du dosage en retour dans le titrage iodométrique du glutathion. La réaction au nitroprussiate de sodium a été trouvée négative pour les poudres d'ovaire, de thyroïde, de glande mammaire et de rein. L'auteur a effectué ses dosages sur 5 grammes de poudre avec la méthode de Mme Randoin et René Fabre (334), modifiée cependant, car elle finissait par un dosage en retour. En admettant qu'elle ait obtenu 25 cm³ de filtrat, on peut affirmer, puisque la méthode est encore sensible à 1 mg. pour 100 cm³ de liqueur, que les 25 cm³ de filtrat, soit 5 grammes de poudre des organes précités, ne contenaient pas 0 mg. 20 de dérivés sulfhydrylés, ce qui correspond pour 100 grammes de poudre à 4 mg. Or, dans ces poudres d'organes ne contenant pas 4 mg. de dérivés sulfhydrylés pour 100 g., l'auteur a trouvé, par la méthode en retour, les taux surprenants de 338 mg. 5 pour la poudre d'ovaire, de 212 mg. 8 pour celle de thyroïde, de 184 mg. pour la glande mammaire et enfin de 430 mg. 8 pour 100 g. de poudre de rein. Il était difficile de faire de façon plus évidente le procès du titrage iodométrique en retour du glutathion.

Un autre inconvénient de la méthode iodométrique, celui-ci beaucoup moins important que la difficulté

d'appréciation du terme de la réaction, est le manque de stabilité des solutions d'iode, qui contraint à effectuer sa vérification, sinon avant chaque dosage, du moins très fréquemment. Hess (166) y obvia en utilisant, pour le dosage du glutathion, le dosage à l'iodate de potassium, employé par Okuda (317) pour la cystéine, les solutions d'iodate étant en effet plus stables. Hess (166) prend 10 cm³ de filtrat sanguin auquel il ajoute de l'acide chlorhydrique et de l'iodure de potassium et qu'il titre avec une solution 0,005 N d'iodate de potassium jusqu'à obtention d'une teinte jaune. Woodward et Fry (415) reprirent cette méthode, mais n'obtinrent pas de point de virage certain; aussi utilisèrent-ils une solution d'iodate plus diluée, soit 0,001 N, et l'empois d'amidon comme indicateur interne.

La méthode de Tunnicliffe (373), considérée soit telle que son auteur l'a décrite, soit suivant une de ses modifications quelconques, a l'inconvénient de doser, outre le glutathion, tous les autres dérivés sulfhydrylés et, d'après certains auteurs, des substances étrangères agissant sur l'iode. Binet et Weller (38) ont mis au point une méthode qui leur paraît ne doser que le glutathion; elle est basée sur le fait que l'on peut obtenir une précipitation quantitative du glutathion, sans oxydation de son groupement sulfhydrylé, par le lactate de cadmium, pour un pH compris entre 6 et 7. Le glutathion oxydé et l'acide ascorbique ne sont pas précipités dans ces conditions. La cystéine est précipitée entre pH 3 et pH 4,6, ce qui permet une séparation de la cystéine et du glutathion. Les auteurs opèrent de la façon suivante : 1 à 2 grammes de tissu sont prélevés pour le dosage et épuisé à trois reprises à l'aide de 5 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100 chaque fois. Le filtrat est transvasé dans un tube à centrifuger et additionné de trois à quatre gouttes d'une solution de bleu de bromothymol, puis neutralisé comme suit : on commence la neutralisation avec une solution concentrée de soude caustique (50 p. 100 en volume) en agitant constamment, on termine avec une solution plus diluée, à 2 p. 100, jusqu'au premier virage au bleu qui doit être stable deux minutes environ. A l'extrait ainsi neutralisé, on ajoute 2 cm³ d'une solution de lactate de cadmium à 1 p. 100.

L'extrait vire au jaune ou au vert et l'on ajoute alors une ou deux gouttes de la solution de soude à 2 p. 100 jusqu'à nouveau virage au bleu. Immédiatement, un louche apparaît, et après une heure ou deux le précipité floconneux se dépose. On centrifuge la solution, le précipité est redissous dans 10 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et la solution ainsi obtenue est titrée par une solution d'iode 0,004 N en présence d'empois d'amidon.

Il est difficile d'apprécier cette méthode, très récente, les auteurs n'ayant publié que peu de chiffres; ils mentionnent cependant que les résultats sont inférieurs à ceux obtenus par les méthodes usuelles.

Nous venons de passer en revue les critiques suggérées par la méthode de Tunnicliffe (373) et les diverses modifications de cette méthode qui en ont été la conséquence.

Certains auteurs ont cru devoir repousser tout à fait le dosage iodométrique du glutathion et ses diverses modalités et ont ainsi élaboré différentes méthodes qui, pour la plupart, se terminent par un dosage colorimétrique, ce qui permet de dire, *a priori*, qu'avec ces modes de dosage on ne pourra compter, au maximum, que sur une approximation de 5 p. 100.

2. Méthodes colorimétriques.

Nous ferons là encore, pour la commodité de l'exposé, une division arbitraire de ces dosages, nous basant pour cela sur les réactions caractéristiques qui en sont le principe.

a) Méthodes fondées sur la réaction au nitroprussiate.

Nous avons vu que, dès 1923, Abderhalden et Wertheimer (1) avaient mis au point une méthode colorimétrique de dosage de la cystéine reposant sur cette réaction. Ils comparaient la teinte pourpre obtenue à un mélange de rouge de Bordeaux et de bleu de méthylène en solution à 1 pour 30.000 préalablement étalonné avec des quantités connues de cystéine. Les limites de ce dosage étaient comprises entre 0 mg. 1 et 1 mg. avec une erreur de 0 mg. 05. Etant donné qu'ils appliquèrent

ce dosage aux extraits de muscle de cheval, c'est en réalité le glutathion qu'ils dosèrent ainsi. La réaction nitroprussique donnant une coloration très fugace, les auteurs ajoutèrent du cyanure de potassium 0,02 N afin d'empêcher l'oxydation du dérivé sulfhydrylé. Cette méthode ne fut guère utilisée et, pour Tunnicliffe, elle ne serait pas exempte de causes d'erreurs.

Fleming (122) indiqua, en 1931, une méthode de dosage colorimétrique du glutathion dont le principe est à peu près analogue à celui du titrage précédent. Il utilisa la modification de la réaction au nitroprussiate que lui-même avait étudiée précédemment. Il employa comme coloration étalon celle donnée par une solution légèrement acidifiée de rouge neutre dont la teinte rouge violacé est semblable à celle provoquée par les dérivés sulfhydrylés en présence de nitroprussiate de sodium et de chlorure de sodium en milieu alcalin. La température jouant un rôle important, l'auteur recommande de faire toutes les observations à une température égale et aussi basse que possible.

Bierich et Rosenbohm (25) utilisèrent le fait indiqué par Hopkins suivant lequel l'addition de sels ammoniacaux intensifie la réaction au nitroprussiate. Après défécation par l'acide tungstique, ils opérèrent, dans le filtrat saturé de sulfate d'ammoniaque, la réaction au nitroprussiate. Par l'étude des courbes d'absorption et la recherche de l'absorption maxima avec le filtre S 53, à température déterminée, ils parvinrent à établir le taux des dérivés sulfhydrylés.

b) Méthode utilisant un excès de ferricyanure pour oxyder le glutathion et dosant le ferrocyanure formé.

L'idée d'un dosage ferricyanométrique du glutathion revient à Flatow (119), qui décrit une méthode dans laquelle un excès de ferricyanure est utilisé pour oxyder le glutathion dans une solution fortement acide. L'excès de ferricyanure est dosé par l'acide indigosulfonique. L'application de cette méthode au dosage du glutathion sanguin nécessite la précipitation, à l'état de sels d'argent, du chlore, de l'acide urique, de la thiazine et du glutathion, puis la séparation ultérieure de chacun de ces composés. Le glutathion est finalement dosé par

titrage des acides aminés suivant la méthode de Folin, le résultat étant calculé en glutathion. Cette méthode, à cause de sa complication, ne fut guère employée par la suite.

Gabbe (131), nous l'avons vu, utilisa également le ferri-cyanure, mais ce fut Mason (291) qui eut l'idée d'en faire la base d'un dosage colorimétrique. Celui-ci consiste, après avoir oxydé le glutathion réduit par le ferri-cyanure de potassium, à évaluer colorimétriquement le ferrocyanure formé au moyen de la réaction du bleu de Prusse, comme dans le procédé de Folin (126) au ferri-cyanure pour le dosage du sucre sanguin. L'auteur opère à pH 5,9, l'oxydation du glutathion étant alors complète, tandis que la plupart des autres substances présentes, et en particulier l'acide urique, n'interviennent pas. Quelques substances étant partiellement oxydées, l'auteur fait un essai témoin en présence de formaldéhyde et en procédant comme précédemment. Les phénols, l'acide hexuronique, sont oxydés par le ferri-cyanure, même en présence de formol, alors que le glutathion, la cystéine, la thionéine ne sont pas oxydés en présence de ce corps. Par différence des deux chiffres obtenus, on évalue le taux des dérivés sulphydrylés.

c) Méthodes fondées sur l'emploi du réactif phosphotungstique.

Nous avons vu que la cystéine et le glutathion réduit donnaient avec le réactif de Folin et Wu (129), en milieu alcalin, une coloration bleue. Folin et Looney (127) avaient appliqué cette réaction au dosage colorimétrique de la cystéine. Folin et Marenzi (128), puis Marenzi (288), modifièrent cette méthode et l'améliorèrent très sensiblement. Hunter et Eagles (192) l'étendirent au glutathion, mais avec cette restriction qu'elle était inapplicable à son dosage dans le sang ou dans les tissus, la cystéine, l'acide urique, réagissant comme le glutathion. Braier et Marenzi (57), enfin, modifièrent la méthode de façon à la rendre applicable aux liquides biologiques et à stabiliser la coloration. Le sang ou les tissus sont traités par de l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Au filtrat contenant de 0 mg. 7 à 2 mg. 8 de glutathion, les auteurs ajoutent 0 cm³ 2 de sulfite de sodium à 20 p. 100; après

agitation et contact d'une à deux minutes, ils versent successivement 0 cm³ 2 de sulfate de lithium à 20 p. 100, 2 cm³ de carbonate de soude à 20 p. 100, ils agitent et ajoutent 2 cm³ du réactif phosphotungstique, et, après une nouvelle agitation et repos de quatre minutes, diluent à 25 cm³ avec du sulfite de sodium à 2 p. 100 et comparent avant dix minutes au colorimètre avec une solution étalon de cystéine traitée de la même façon. Cette méthode, d'après les auteurs, non seulement titrerait tous les dérivés sulfhydrylés, mais l'acide urique prendrait part à la réaction.

d) Méthode fondée sur la réduction du réactif arsénophosphotungstique par le glutathion.

Cette méthode repose sur le fait constaté par Benedict et Gottschall (19) que le réactif à l'acide arsénophosphotungstique utilisé par l'un des auteurs pour le dosage de l'acide urique, est réduit par le glutathion en solution acide avec formation d'une coloration bleue proportionnelle à la quantité de glutathion.

Cette réduction s'opère en présence d'un grand excès d'acétate de sodium. L'addition de ce sel abaisse notablement l'acidité du réactif et sert de tampon vis-à-vis de celle du filtrat sanguin.

L'intensité de la coloration est peu importante et difficile à apprécier. On l'augmente en utilisant des filtrats dilués seulement au cinquième et en ajoutant du sulfite de sodium qui intensifie la teinte.

e) Méthode néphélométrique de Moncorps et Schmid (307).

Ce mode de dosage du glutathion est placé ici arbitrairement. Il diffère en effet de toutes les autres méthodes proposées. En voici le principe : la liqueur contenant le glutathion, portée à l'ébullition avec une lessive alcaline et une solution saturée d'acétate de plomb, donne, en présence de mousse de platine, naissance à de l'hydrogène sulfuré.

L'hydrogène sulfuré ainsi formé est oxydé par du peroxyde d'hydrogène en solution ammoniacale. Le passage par le sulfate de baryum permet de terminer par une détermination gravimétrique ou néphélométrique.

Ce mode de dosage du glutathion s'applique non seulement à ce corps, mais aussi à tous les dérivés sulfhydrylés, et les auteurs ont eux-mêmes noté que le procédé donnait de bons résultats dans le dosage de l'insuline.

B. — RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMA DE PRECISION DU DOSAGE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES.

Si l'on met à part la méthode de Binet et Weller (36), tous les modes de dosage du glutathion proposés ont un défaut commun qui est leur manque de spécificité.

Tous, en effet, dosent l'ensemble des dérivés sulfhydrylés, et la plupart même englobent dans leurs résultats non seulement les substances à groupement ($-SH$), mais toutes les autres substances réductrices existant dans les filtrats sanguins ou tissulaires, en particulier la thionéine que l'on trouve, d'après Behre et Benedict (18) à raison de 4 mg. 2 à 15 mg. pour 100 cm³ de sang.

Nous devons évidemment tenir compte du fait que ces dosages sont destinés à être utilisés soit dans la clinique, soit dans l'expérimentation physiologique, et que, dans un cas comme dans l'autre, on peut, à défaut de mieux, se contenter de connaître la valeur globale des dérivés sulfhydrylés, tous ces composés ayant un rôle sensiblement comparable.

Il y a, par contre, une condition indispensable à l'interprétation exacte des expériences : c'est l'obtention de résultats constants. Une méthode de dosage ne donnera satisfaction sur ce point que si l'on opère dans des conditions rigoureusement déterminées, quant au prélèvement du sang et des organes, au déféquant utilisé, à la durée de la manipulation et à la température à laquelle le dosage est effectué.

1. Prélèvement du sang des organes.

La condition essentielle est la rapidité du prélèvement. Pour le dosage dans le sang, il sera nécessaire de recueillir le sang, s'écoulant de l'aiguille à ponction, directe-

ment dans le déféquant. Pour les tissus, ils seront soigneusement divisés dès leur ablation, et l'extraction du glutathion sera immédiatement effectuée. S'il s'agit de prélever des tissus *post mortem* et si l'autopsie ne peut pas être immédiatement pratiquée, la réfrigération s'opposera en partie, ainsi que l'ont montré Morel et Delore (310), à la diminution de la teneur en glutathion. Ces auteurs ont trouvé que la teneur en glutathion réduit d'un foie de Cobaye était, immédiatement après la mort, de 260 mg. pour 100 g. de tissu et qu'elle passait, si on l'abandonnait à la température du laboratoire, à un taux de 125 mg. au bout de 24 heures et de 64 mg. après 72 heures. Une portion de ce même tissu, laissée pendant cinq jours à la glacière, contenait encore 235 mg. de glutathion pour 100 g.

2. Durée de la manipulation.

Nous avons vu combien cette notion était importante, le glutathion s'oxydant dans les conditions où s'opèrent les titrages et, surtout, lorsque la défécation n'est pas encore effectuée, le pH du milieu étant alcalin, neutre, ou faiblement acide. Les divers temps de la manipulation devront donc être parfaitement indiqués et surtout être toujours identiques.

3. Température.

Okuda (317) avait trouvé que la quantité d'iode utilisée pour le dosage d'une solution de cystéine variait avec la concentration en acide et avec la température. King et Lucas (227) devaient retrouver des résultats identiques pour le glutathion. De leurs essais, ils conclurent qu'il était nécessaire d'opérer le dosage du glutathion en milieu suffisamment acide et à une température inférieure à 25°.

4. Choix du déféquant.

On peut dire que le choix du déféquant est au moins aussi important que celui du mode de dosage.

C'est un fait parfaitement établi que la plupart des méthodes de dosage donnent des résultats concordants

si on les applique aux solutions de glutathion pur, et, pour aller plus loin, si on les effectue dans des portions aliquotes d'un même filtrat sanguin. L'emploi de déféquants différents conduit, par contre, à des résultats dissemblables. Après avoir examiné quelles sont les conditions que doit remplir un déféquant, nous passerons en revue les divers modes de défécation proposés et nous chercherons s'ils répondent aux conditions indiquées.

a) Conditions que doit remplir un déféquant.

Lorsque Tunncliffe (373) a proposé l'acide trichloracétique comme déféquant, il a énuméré les avantages que ce produit présentait :

1° Le filtrat débarrassé des matières protéiques est limpide;

2° L'acide trichloracétique ne gêne pas le dosage ultérieur;

3° L'acidité de la solution empêche l'oxydation des groupes (—SH), qui pourrait se produire durant la filtration;

4° Le glutathion n'est pas précipité par l'acide trichloracétique.

Les conditions essentielles que doit remplir un déféquant se trouvent ainsi parfaitement énoncées.

On pourrait être tenté d'ajouter que le filtrat doit être incolore, mais ceci peut rentrer dans la seconde condition, car la coloration du filtrat gêne le dosage ultérieur, qu'il soit effectué par une méthode iodométrique ou colorimétrique.

Woodward et Fry (415) demandent que la défécation soit telle :

1° Qu'il n'y ait pas de perte par autoxydation du glutathion réduit;

2° Que le glutathion passe entièrement dans le filtrat.

Ces deux conditions sont remplies par un déféquant répondant aux exigences de Tunncliffe, puisqu'il réclame un pH suffisant pour qu'il n'y ait pas d'autoxydation et, d'autre part, qu'il souligne qu'il est nécessaire que le glutathion ne soit pas précipité, ce qui conditionne son passage dans le filtrat.

Dans le cours de leur travail, Woodward et Fry (415), ayant proposé un déféquant, lui trouvent en outre les avantages suivants : la filtration est rapide et le rendement en filtrat est intéressant. Nous étudierons donc, lors de la discussion des modes de défécation proposés, outre les qualités requises par Tunnicliffe, ces avantages secondaires.

b) Principaux déféquants préconisés pour le dosage du glutathion réduit.

L'acide trichloracétique préconisé par Tunnicliffe est employé par de nombreux auteurs. L'acide tungstique se montre un bon précipitant des substances protéiques du sang, et la technique de Folin et Wu (129) est une des plus employées pour les titrages biologiques. Herbert, Bourne et Groen (165) étudièrent les substances réductrices du sang autres que le glucose et recherchèrent pour quelle part le glutathion intervenait dans les taux de glycémie établis par diverses méthodes. Ils furent ainsi amenés à appliquer la précipitation tungstique à des mélanges de plasma et de glutathion, et constatèrent que celui-ci passait intégralement dans le filtrat. Mason (291), dans son dosage colorimétrique du glutathion, utilisa la défécation sulfotungstique de Folin et Wu. Le pH du filtrat obtenu, 5,5 environ, favorise l'autoxydation du glutathion; aussi, Mason (292), dans une communication ultérieure, suggéra une modification du déféquant de façon à augmenter l'acidité. Au lieu d'ajouter les sept volumes d'eau de la méthode originale, il n'en ajoutait plus que deux volumes et obtenait ainsi une dilution au $1/5^{\circ}$ au lieu de la dilution au $1/10^{\circ}$. Schelling (355) utilisa ce dernier mode de défécation.

Benedict et Newton (20) recherchèrent si un autre mode de précipitation des protéines du sang ne pourrait pas dans certains cas être substitué à l'acide tungstique; celui-ci, dans le cas de la thionéine, par exemple, ne se montrait pas entièrement satisfaisant et provoquait une précipitation partielle de la substance. Ils proposèrent l'acide molybdique, et ce mode de défécation devait être appliqué au dosage du glutathion par Hess (166). Peu

de temps après avoir suggéré l'emploi de cet acide, Benedict et Newton (20) notèrent que, si aucune perte de thionéine ne se produisait lors de l'emploi de l'acide molybdique, pour la défécation du sang, il n'en était pas de même du glutathion qui était précipité en quantité importante. C'est alors qu'ils mirent au point la défécation par l'acide tungstomolybdique qui ne produirait aucune perte de constituants non protéiques.

Woodward et Fry (415) firent une étude critique de l'emploi de l'acide trichloracétique et de l'acide tungstique comme déféquant pour le dosage du glutathion. Des expériences faites avec des solutions d'acide tungstique à divers pH montrèrent qu'une proportion considérable de glutathion réduit disparaît rapidement, dans des solutions légèrement acides, par autoxydation. Les taux de glutathion du sang humain, notés par Downes et par Schelling (355), qui utilisèrent la méthode de Mason (291), sont beaucoup plus faibles que ceux indiqués habituellement. Ceci serait dû, d'après Woodward et Fry (415), à l'autoxydation qui se produit lors de la défécation.

Quant à l'acide trichloracétique, ces derniers auteurs en rejettent l'emploi pour des raisons tirées de la discussion des travaux de Gabbe (131), Gulland et Peters (146), puis Schelling (355), qui ont trouvé moins de dérivés sulfhydrylés dans les filtrats trichloracétiques que dans les filtrats tungstiques, ce qui, pour Woodward et Fry (415), indiquerait que le glutathion est incomplètement extrait par l'acide trichloracétique. Bierich et Rosenbohm (25) ont trouvé également que les taux de glutathion dans les filtrats trichloracétiques sont plus faibles que ceux obtenus après défécation par l'acide tungstique. Mais ils n'interprètent pas ce fait de la même façon. Pour eux, cette différence serait due à la présence d'une substance X qui passerait dans les filtrats tungstiques. En tous cas, les différences trouvées ne seraient pas dues à la différence de pH, car si on acidifie le filtrat tungstique par de l'acide sulfurique pour obtenir le pH 3,4, qui est celui du filtrat trichloracétique, on retrouve les mêmes écarts.

Woodward et Fry (415), ayant éliminé ces modes de défécation, proposèrent l'emploi de l'acide sulfosalicylique qui, à leur avis, remplirait toutes les conditions requises.

c) Etude des divers modes de défécation proposés.

Pour cette étude, nous avons utilisé, dans une première série d'expériences, des filtrats sanguins préparés suivant la technique indiquée par les auteurs ayant proposé les divers modes de défécation et, pour chacun de ces filtrats, nous avons recherché si les conditions requises étaient réalisées. Dans un deuxième groupe d'essais entrepris pour montrer que le glutathion n'était pas précipité par ces déféquants, nous avons ajouté du glutathion pur, cristallisé, en proportion connue, à du sang dont nous avons évalué la teneur en glutathion.

Après défécation, effectuée suivant les diverses méthodes proposées, nous avons recherché si le glutathion ajouté se retrouvait intégralement dans le filtrat.

Voici les techniques de défécation que nous avons utilisées :

I.	— Sang.	10 cm ³
	Acide trichloracétique à 5 p. 100	90 cm ³
II.	— Sang.	10 cm ³
	Acide trichloracétique à 10 p. 100	90 cm ³
III.	— Sang.	10 cm ³
	Acide trichloracétique à 20 p. 100	90 cm ³
IV.	— Sang.	10 cm ³
	Eau.	70 cm ³
	Solution de tungstate de soude à 10 p. 100	10 cm ³
	SO ⁴ H ² N 2/3	10 cm ³
V.	— Sang.	10 cm ³
	Eau.	20 cm ³
	Solution de tungstate de soude à 10 p. 100	10 cm ³
	SO ⁴ H ² N 2/3	10 cm ³

VI. — Sang.	10 cm ³
Eau.	15 cm ³
SO ⁴ H ² N 2/3	15 cm ³
Solution de tungstate de soude	10 cm ³
VII. — Sang.	10 cm ³
Eau distillée	70 cm ³
SO ⁴ H ² 0,4 N	10 cm ³
Solution à 5 p. 100 d'acide molybdique dans la soude 0,25 N	10 cm ³
VIII. — Sang.	10 cm ³
Eau distillée	70 cm ³
Solution tungstate-molybdate	10 cm ³
SO ⁴ H ² 0,62 N	10 cm ³

La solution tungstate-molybdate est préparée de la façon suivante :

10 g. d'acide molybdique sont portés une ou deux minutes à l'ébullition, avec 50 cm³ de solution normale de soude. On ajoute 150 cm³ d'eau et le tout, refroidi, est mélangé à 600 cm³ d'eau dans laquelle on a préalablement dissous 80 g. de tungstate de soude. On dilue à un litre.

IX. — Laquer 10 cm³ de sang dans 80 cm³ d'eau distillée.

Après 10 minutes, ajouter lentement et en agitant 10 cm³ de solution d'acide sulfosalicylique à 22 p. 100.

Le sang utilisé était du sang de Bœuf défibriné par agitation avec des perles de verre.

Nous avons employé pour les dosages du glutathion la méthode de Mme Randoïn et René Fabre (334).

n correspond au nombre de centimètres cubes d'iode N/500 nécessaires pour atteindre le terme du dosage en employant le nitroprussiate comme indicateur externe.

n' représente le nombre de centimètres cubes d'iode N/500 nécessaires pour atteindre le terme du dosage en utilisant l'empois d'amidon.

G et G' expriment en mg. les quantités de glutathion contenues dans 100 cm³, obtenues soit par la réaction au nitroprussiate, soit par la réaction à l'empois d'amidon.

CARACTÈRES ET TENEUR EN GLUTATHION DES DIVERS FILTRATS

Numéros des Mé- thodes utilisées	Durée de la filtration	Quantité de filtrat obtenu	Coloration du filtrat	Nombre de cm ³ d'iode N/500			Taux du Glutathion en mg. pour 100 cm ³	
				dans le filtrat		dans le té- moin n'	G	G'
				n	n'			
I	rapide	88 cm ³	incolore	0,72	0,91	0,10	44,2	49,6
II	rapide	90 cm ³	incolore	0,72	0,93	0,10	44,2	50,8
III	rapide	92 cm ³	incolore	0,75	1,03	0,10	46	57,2
IV	assez lente	50 cm ³	incolore	0,54	0,81	0,16	33,2	40
V	lente	40 cm ³	incolore	0,36	0,60	0,13	22,1	28,8
VI	lente	40 cm ³	incolore	0,36	0,72	0,21	22,1	31,4
VII	assez lente	60 cm ³	incolore	0,28	0,54	0,16	17,2	33,4
VIII	lente	53 cm ³	incolore	0,59	0,95	0,19	41,4	46,4
IX	assez rapide	82 cm ³	rose		1,18	0,22		60

Les filtrats IV, VII, VIII ont des pH voisins de 5; pour les autres, le pH est inférieur à 1,2.

En examinant ce tableau, on constate que les filtrats trichloracétiques filtrent plus rapidement que les autres, la quantité de liqueur obtenue étant plus abondante. Mais ce n'est là qu'un avantage secondaire que nous ne ferons pas entrer en jeu pour le choix du déféquant à utiliser. En effet, si la filtration est lente et difficile, rien n'empêche d'employer la centrifugation.

Tous les filtrats obtenus étaient limpides et tous, sauf un, étaient incolores. Le filtrat IX, obtenu après défécation à l'acide sulfosalicylique, possédait une teinte rose légèrement mauve qui gêne considérablement le dosage ultérieur et rend impossible le dosage iodomé-

trique en utilisant le nitroprussiate comme indicateur externe; mais, même en utilisant l'empois d'amidon, la teinte rose est gênante et rend difficile l'appréciation du terme de la réaction.

Si maintenant nous considérons les résultats obtenus avec les diverses méthodes, nous constatons que les valeurs les plus élevées ont été obtenues en premier lieu avec le filtrat IX, mais nous ne pouvons guère en tenir compte, étant donnée la difficulté de voir le virage dans une liqueur colorée. Ensuite viennent les divers filtrats trichloracétiques qui nous ont donné des chiffres plus forts que ceux obtenus avec les autres méthodes.

Nous avons poursuivi nos essais en recherchant si les taux de glutathion trouvés variaient lorsqu'on effectuait les dosages un certain temps après l'obtention du filtrat.

EFFET DU TEMPS SUR LE TAUX DU GLUTATHION
DANS LES DIVERS FILTRATS

Numéros des méthodes utilisées	Taux de Glutathion (en mg. pour 100 cm ³)									
	immédiatement après défécation		après 2 h.		après 6 h.		après 24 h.		après 36 h.	
	G	G'	G	G'	G	G'	G	G'	G	G'
I	44,2	49,1	44,2	49,1	41,7	44,8	23,9	32,5	22,1	29,4
II	44,2	49,7	44,2	49,7	41,7	44,8	25,8	36,8	23,3	30,7
III	45,4	53,4	45,4	53,4	43	46	27	36,8	23,9	30,7
IV	31,9	39,3	31,9	38,7	22,7	29,5	11,05	16,3	8,6	13,5
V	25,2	32,5	23,3	30,1	17,8	22,7	15,55	18	14,3	16,75
VI	25,2	31,9	25,2	31,9	25,2	31,3	22,1	27,8	18,4	21,5
VII	16,6	22,1	14,1	19,6	12,3	17,2	7,5	12	4,3	5,55
VIII	39,9	47,9	38,6	45,4	26,4	31,3	12,9	18,4	8,6	12,9
IX		52,2		51		39,3		29,5		24,6

Les dosages effectués après 24 heures ont donné, avec tous les filtrats sanguins, des résultats très inférieurs à ceux obtenus pour les titrages faits immédiatement après la défécation. Après 6 heures, les valeurs obtenues sont déjà nettement abaissées, et ce fait est particulièrement net pour les filtrats ayant un pH voisin de 5. Les liqueurs trichloracétiques se comportent relativement mieux que les autres; cependant, l'enseignement que nous retirons de ce second groupe d'essais, n'est pas tant de nous faire préférer telle méthode de défécation à telle autre, mais de nous montrer que les dosages de glutathion doivent être faits rapidement et dans des conditions bien déterminées, si l'on ne veut pas risquer de tirer des conclusions erronées des dosages effectués.

Dans un dernier groupe d'expériences, nous avons ajouté à du sang une quantité déterminée de glutathion réduit pur, soit 138 mg. pour 100 cm³ de sang; nous avons ensuite recherché quelle proportion nous retrouvions dans les filtrats obtenus après défécation par les diverses méthodes préconisées.

Numéros des méthodes utilisées	TAUX DE GLUTATHION RÉDUIT (en mg. pour 100 cm ³)				QUANTITÉS DE GLUTATHION RETROUVÉES SUR LES 138 mg. AJOUTÉS	POURCENTAGE DE GLUTATHION RÉDUIT RETROUVÉ
	DANS LE SANG SANS ADDITION DE GLUTATHION		DANS LE SANG APRÈS ADDITION DE GLUTATHION			
	G	G'	G	G'		
I	42,7	56,3	179,7	194,1	138,	100
II	42,9	57,1	179,5	193,5	136,6	98,9
III	43,	57,4	178,3	192,9	135,3	98
IV	29,8	42,9	105,9	118,4	76,1	55,
V	27,6	40,8	129,4	142,5	101,8	73,8
VI	29,9	45,3	162,6	178,0	132,7	96,1
VII	16,1	32,7	77,6	95,8	61,5	44,4
VIII	31,5	48,1	101,3	116,9	69,8	50,5
IX		56,5		176,1	119,6	86,8

Les filtrats trichloracétiques ont, là encore, donné les meilleurs résultats; nous avons donc utilisé l'acide trichloracétique comme déféquant lors de tous nos essais ultérieurs pour lesquels nous avons, du reste, employé la méthode de Mme Randoin et René Fabre (334).

Au cours de ces essais, une question s'était posée à nous. Les substances réductrices qui disparaissent spontanément dans les filtrats sont-elles du glutathion réduit, ou sont-elles composées de corps réducteurs qui interfèrent avec le glutathion lors du dosage iodométrique? Ou plus simplement, lorsqu'on ajoute du glutathion réduit à du sang, ce glutathion disparaît-il lui aussi des filtrats?

Nous avons, pour répondre à cela, effectué dans les filtrats, obtenus par défécation du sang additionné de glutathion, des dosages après des temps plus ou moins longs, et nous avons pu voir que le pourcentage de glutathion réduit retrouvé diminuait lorsque le temps qui séparait la défécation du dosage proprement dit augmentait.

Nous avons ajouté à du sang de Bœuf défibriné du glutathion réduit pur à raison de 140 mg. pour 100 cm³ de sang. Nous avons traité ce sang suivant les diverses méthodes de défécation et, dans les filtrats, nous avons dosé le glutathion par la technique habituelle.

Parallèlement, nous avons effectué les mêmes opérations : défécation et dosage dans le même sang non additionné de glutathion.

Les résultats obtenus sont consignés dans les trois tableaux suivants.

DOSAGES EFFECTUÉS IMMÉDIATEMENT
APRÈS LA DÉFÉCATION

Numéros des méthodes utilisées	TAUX DE GLUTATHION RÉDUIT (en mg. pour 100 cm ³)				QUANTITÉS DE GLUTATHION RETROUVÉES SUR LES 140 mg. AJOUTÉS	POURCEN- TAGE DE GLUTATHION RÉDUIT RETROUVÉ
	DANS LE SANG SANS ADDITION DE GLUTATHION		DANS LE SANG APRÈS ADDITION DE GLUTATHION			
	G	G'	G	G'		
I	37,3	48,1	177,1	188,7	139,8	99,85
II	37,5	48,7	176,4	187,6	138,9	99,2
III	37,5	48,8	175,8	187	138,3	98,7
IV	23,7	35,4	101,9	122,1	79,2	56,5
V	19,9	29,2	122,8	135,2	102,9	73,5
VI	21,4	33,7	155,8	167,3	134,4	96
VII	14,9	25,1	80	92,8	65,1	46,5
VIII	24,7	35,2	95,7	107,4	71	50,7
IX		49,3		172	122,7	87,6

DOSAGES EFFECTUÉS 12 HEURES APRÈS LA DÉFÉCATION

Numéros des méthodes utilisées	TAUX DE GLUTATHION RÉDUIT (en mg. pour 100 cm ³)				QUANTITÉS DE GLUTATHION RETROUVÉES SUR LES 140 mg. AJOUTÉS	POURCEN- TAGE DE GLUTATHION RÉDUIT RETROUVÉ
	DANS LE SANG SANS ADDITION DE GLUTATHION		DANS LE SANG APRÈS ADDITION DE GLUTATHION			
	G'	G'	G'	G'		
I	24,3	35,2	118	129,6	93,7	64
II	25,2	35,5	137,7	148,2	112,5	80,3
III	25,8	35,4	140	151	114,2	81,5
IV	11,2	23,4	28,3	37,9	17,1	12,2
V	16,3	27,1	65,9	77,1	49,6	35,4
VI	20,6	31,9	133,6	143,8	113	80,7
VII	7,2	17,6	32	46,3	24,8	17,7
VIII	12,7	24,3	66,7	77,5	54	38,5
IX	-	29,8		133,2	103,4	73,8

DOSAGES EFFECTUÉS 24 HEURES APRÈS LA DÉFÉCATION

Numéros des méthodes utilisées	TAUX DE GLUTATHION RÉDUIT (en mg. pour 100 cm ³)				QUANTITÉS DE GLUTATHION RETROUVÉES SUR LES 140 mg. AJOUTÉS	POURCEN- TAGE DE GLUTATHION RÉDUIT RETROUVÉ
	DANS LE SANG SANS ADDITION DE GLUTATHION		DANS LE SANG APRÈS ADDITION DE GLUTATHION			
	G	G'	G	G'		
I	21,6	30,7	114,5	126,	92,9	66,3
II	23,9	33,8	117,7	127,9	93,8	67,
III	24,1	35,2	118,9	129,2	94,8	67,7
IV	7,4	18,4	22,4	34,1	15,	10,6
V	13,5	24,7	63,1	72,9	49,6	35,4
VI	16,8	27,6	128,9	139,5	112,1	80 ,
VII	5,2	14,8	22,5	34,3	17,3	12,3
VIII	9,1	20,5	62,7	74,1	53,6	38,2
IX		23,9		115,1	91,2	65,1

Les résultats obtenus nous montrent que, même dans les filtrats très acides, le glutathion subit une grosse perte, qui s'accroît avec le temps qui sépare le dosage de la filtration.

Nous ne saurions mieux terminer cette étude que sur cette remarque : après avoir fait choix d'une méthode de dosage des dérivés sulfhydrylés, il faut opérer constamment dans les mêmes conditions, ce qui revient à dire que, tant qu'une méthode standard ne sera pas établie, il sera difficile de comparer les chiffres obtenus par des expérimentateurs différents.

III

Dosage du glutathion existant à l'état oxydé

Les réactions caractéristiques du glutathion ne sont valables que lorsque celui-ci existe sous sa forme réduite. Le glutathion oxydé ne peut pas être décelé directement, et une réduction préalable est nécessaire. Or, dans le sang et les tissus, le glutathion existe sous deux formes : glutathion réduit GSH et glutathion oxydé GSSG. Il est donc nécessaire de pouvoir, non seulement déceler la forme oxydée, mais aussi de la doser.

Bierich et Kalle (23), dans ce but, dosent la totalité du soufre organique des filtrats sanguins ou tissulaires et en déduisent la valeur du glutathion total, mais d'une façon générale on préfère évaluer le glutathion oxydé en effectuant :

- 1° La réduction du glutathion oxydé;
- 2° Le dosage sous forme réduite du glutathion total.

Si X est la valeur du glutathion réduit existant dans le sang ou le tissu, et X' la valeur du glutathion réduit obtenu par réduction du glutathion oxydé, le dosage donne $X + X'$, d'où on déduit X' .

Nous étudierons donc ici uniquement le premier temps, c'est-à-dire la réduction du glutathion oxydé, le deuxième temps consistant dans un dosage de glutathion réduit.

Réduction du glutathion oxydé.

Nous avons vu que le glutathion oxydé traité par les réducteurs les plus faibles se transformait en glutathion réduit. Mauthner (295), puis de nombreux auteurs, ont montré que la forme disulfure se transformait sous l'action d'une solution aqueuse de cyanure alcalin en dérivé sulfhydrylé.

Pour le dosage du glutathion oxydé, il est nécessaire d'employer un agent réducteur tel que la transformation soit rapide et surtout intégrale. Les méthodes utilisées sont variées et le mode opératoire change suivant le déféquant utilisé.

Si celui-ci est l'acide trichloracétique, le glutathion oxydé peut être réduit, soit par le magnésium d'après Thompson et Voegtlin (367), soit à l'ébullition par la poudre de zinc et l'acide chlorhydrique suivant Hess (166). Delaville et Kowarski (84) emploient avec l'acide chlorhydrique concentré de la grenaille de couple Zinc-Cuivre obtenue par immersion de la grenaille de zinc dans une solution de sulfate de cuivre. La grenaille de zinc ajoutée à l'acide chlorhydrique est préférée par Acharé, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5).

Litarczek, Tomesco et Nestoresco (268) opèrent la défécation trichloracétique après la réduction; de plus, ayant constaté l'importance d'opérer les dosages du glutathion à une pression constante en O_2 et en CO_2 , ils effectuent la réduction de la façon suivante : 4 à 5 cm³ de sang total veineux défibriné par agitation dans un flacon avec des perles de verre, sont introduits dans un tonomètre de Barcroft de 250 à 300 cm³ de capacité, rempli d'hydrogène à la pression atmosphérique après évacuation préalable de l'air par une pompe à vide. On agite pendant 20 minutes dans un bain-marie à 38°; le sang est alors réduit.

Kühnau (234), qui emploie l'acide trichloracétique comme déféquant pour le dosage du glutathion réduit, utilise, lors de la détermination du glutathion total, l'acide sulfotungstique. Pour réduire le glutathion oxydé, il ajoute au liquide limpide obtenu par centrifugation un cm³ de solution fraîche de cyanure de so-

dium à 5 p. 100, laisse le tout à l'obscurité pendant une heure, et ajoute alors 2 cm³ d'acide acétique pur. Schelling (355), qui utilise également l'acide sulfotungstique comme déféquant, préfère réduire le glutathion oxydé par addition à 25 cm³ de filtrat sanguin de cinq gouttes d'acide sulfurique concentré, suivi de poudre de magnésium ajoutée par petites fractions. La réduction est terminée lorsque l'acidité de la solution vérifiée à l'aide du papier au rouge Congo est faible.

Woodward et Fry (415) réduisent par la poudre de zinc le glutathion oxydé du sang, celui-ci étant préalablement déprotéiné par l'acide sulfosalicylique.

Avant d'adopter un mode de dosage du glutathion total, nous avons fait divers essais afin de comparer les diverses méthodes proposées et de répondre à plusieurs questions que nous nous étions posées.

Nous avons fait des dosages de glutathion après réduction, soit de filtrat sanguin, soit de solution de glutathion oxydé pur.

Voici les différents modes de réduction essayés :

1. — Filtrat trichloracétique	20 cm ³
Poudre de zinc	2 g.
Acide chlorhydrique	4 cm ³
2. — Filtrat trichloracétique	20 cm ³
Grenaille de zinc	2 g.
Acide chlorhydrique	4 cm ³
3. — Filtrat trichloracétique	20 cm ³
Zinc en lames	2 g.
Acide chlorhydrique	4 cm ³
4. — Filtrat trichloracétique	20 cm ³
Couple Zn—Cu ¹	2 g.
Acide chlorhydrique	4 cm ³

1. Nous avons préparé le couple zinc-cuivre de la façon suivante : Des lames de zinc très minces sont enroulées puis introduites dans un matras. On ajoute de l'eau acidulée par l'acide sulfurique au centième, pour décaper les lames de zinc. Au bout de quelque temps, on enlève l'eau acide, on la remplace par une solution de sulfate de cuivre à 2 p. 100. Le cuivre se précipite sur le zinc, et on laisse en contact jusqu'à décoloration de la liqueur, que l'on décante. On ajoute de nouveau une solution de sulfate de cuivre et, après décoloration, on décante. Le couple formé est lavé avec de l'eau distillée puis avec de l'alcool concentré.

5. — Filtrat trichloracétique 20 cm³
 Poudre de magnésium 2 g.
 Acide chlorhydrique 4 cm³
6. — Filtrat trichloracétique 20 cm³
 Poudre de zinc 2 g.
7. — Filtrat trichloracétique 20 cm³
 Poudre de magnésium 2 g.

I. — TENEUR EN GLUTATHION TOTAL D'UN FILTRAT SANGUIN,
 RECHERCHÉ APRÈS RÉDUCTION PAR DIVERSES MÉTHODES.

Ces essais ont été faits en prélevant pour chacun d'eux 20 cm³ de filtrat trichloracétique de sang de Bœuf auxquels nous ajoutons le réducteur choisi. Nous complétons à 25 cm³ avec une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Après contact de 15 minutes, le mélange était filtré. Dans une portion aliquote du filtrat, soit 20 cm³, nous effectuons le dosage par la méthode iodométrique. Nous avons refait ces essais en laissant le réducteur en contact avec les filtrats sanguins : 30 minutes, 1 heure, et 24 heures.

Numéros correspon- dants aux modes de réduction utilisés	Glutathion total exprimé en glutathion réduit (en mg. pour 100 g.)							
	Temps de contact							
	15 minutes		30 minutes		60 minutes		24 heures	
	G	G'	G	G'	G	G'	G	G'
1	40,2	46,1	35,4	39,8	31,3	35,1	22,1	27,3
2	49,1	55,7	49,1	55,6	49,1	55,4	43,6	47,9
3	44,2	50,8	42,3	47,2	34,6	39,4	25,2	30,3
4	43,6	49,5	43,6	49,1	42,3	48,5	30,7	36,2
5	38,4	54,3	33,7	50,6	28,4	44,9	21,3	38,5
6	31,6	36	21,6	26,2	18,7	23,5	15,1	19,6
7	37,4	41,5	20,7	24,3	17,1	22,9	15,2	20

Le taux du glutathion réduit du filtrat sanguin était avant réduction :

$$G = 36,2$$

$$G' = 41,7$$

On note, dès l'examen de ce tableau, les deux faits suivants :

1° Les diverses méthodes de réduction utilisées donnent des résultats très dissemblables. C'est ainsi que le glutathion oxydé, exprimé en mg. pour 100 cm³, serait suivant les diverses techniques utilisées :

		1	2	3	4	5	6	7
Glutathion oxydé	G	4	12,9	8	4	2,2	—	1,2
	G'	4,4	14	9,1	7,8	12,5	—	—

La grenaille de zinc donne les chiffres les plus forts. Certains procédés, telle l'utilisation de la poudre de zinc sans addition d'acide chlorhydrique concentré, ont donné pour le glutathion total des chiffres inférieurs au taux de glutathion réduit du sang utilisé.

2° Si on met à part la grenaille de zinc avec laquelle les chiffres obtenus sont comparables, que le contact ait duré 15, 30 ou 60 minutes, tous les autres modes de réduction provoquent un abaissement rapide du taux du glutathion par contact prolongé au delà de 15 minutes.

II. — DOSAGE DU GLUTATHION OXYDÉ DANS UNE SOLUTION TRICHLORACÉTIQUE DE CE COMPOSÉ.

Nous avons utilisé du glutathion oxydé préparé suivant la technique indiquée précédemment et nous en avons dissous dans de l'eau distillée un poids tel que 1 cm³ de la solution corresponde à 25 mg. de glutathion oxydé.

Nous avons refait les essais précédents en remplaçant le filtrat sanguin trichloracétique par 18 cm³ de solution

d'acide trichloracétique additionnés de 2 cm³ de la solution de glutathion oxydé.

N° du mode de réduction utilisé	Glutathion oxydé (en mg. par cm ³)							
	Temps de contact							
	15 minutes		30 minutes		60 minutes		24 heures	
	G	G'	G	G'	G	G'	G	G'
1	17,3	17,8	14,6	15,3	12,7	13,4	9,1	10,4
2	21,6	21,4	20	20,7	19,3	20,1	15,6	16,7
3	24,1	24,6	24	24,6	24	24,4	19,8	20,3
4	22,3	23,5	20,1	20,8	18,4	19,1	13,2	14
5	7,9	20	7	18,4	6,4	17,3	4,9	16,7
6	7,2	7,2	5,3	6	4,1	4,7	2,9	3,5
7	3	3,8	2,7	2,9	2,1	2,3	1,6	1,9

Ces essais confirment les précédents. Cependant, un chiffre nous a paru anormal, c'est le taux de glutathion obtenu après réduction suivant le mode 5 : l'écart entre G et G' est anormalement élevé comparé aux différences observées entre ces deux valeurs dans tous les autres essais. Nous avons pensé que cet écart pouvait être dû à ce que le mélange : solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100, poudre de magnésium et acide chlorhydrique concentré, possédait un pouvoir réducteur propre vis-à-vis des solutions d'iode. Ce fait nous a donc conduit à rechercher le pouvoir réducteur sur les solutions titrées d'iode de tous les mélanges utilisés. Ce pouvoir a été trouvé nul pour tous, sauf pour le 5, où le mélange :

Poudre de magnésium	2 g.
Acide chlorhydrique concentré	4 cm ³
Solution à 10 p. 100 d'acide trichloracétique q. s. p.	25 cm ³

nous a donné un pouvoir réducteur correspondant à 12 mg, 1 de glutathion réduit. Ceci explique donc fort bien l'écart constaté dans le tableau. Il est probable que cette action de la poudre de magnésium est due à la

présence d'impuretés, mais il est difficile de les éliminer complètement.

De ces essais, nous pouvons conclure que le glutathion oxydé ne peut être réduit qu'en milieu très acide, les modes 6 et 7 étant à éliminer. D'autre part, dans ces conditions d'acidité, l'action de la poudre de zinc ou de magnésium est trop fugace ou trop énergique et ne donne pas de résultats satisfaisants. Nous conseillons donc l'emploi de la grenaille de zinc pur, à condition que les fragments en soient petits. Le dosage devra, dans tous les cas, être effectué après 15 ou 30 minutes de contact, celui-ci ne pouvant être prolongé davantage sans entraîner des pertes de glutathion.

Méthode de dosage utilisée au cours de nos recherches

Nous indiquerons ici, avec quelques détails, la technique que nous avons utilisée et qui nous a permis d'obtenir des résultats aussi satisfaisants que possible.

1° Dosage du glutathion réduit.

a) *Dans les tissus.* — Nous avons suivi exactement la méthode de Mme Randoin et René Fabre (334), que nous reproduisons ci-dessous.

Un poids connu de tissu, recueilli immédiatement après la mort de l'animal est haché finement et rapidement; la pulpe, mélangée avec du sable lavé, est traitée par un poids égal de solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100.

On filtre à la trompe et on traite de nouveau le résidu, à deux reprises, de la même manière. L'épuisement est alors complet, en général. Toutefois, en ce qui concerne les tissus riches en glutathion, tels que le foie, l'épuisement, pour être complet, exige parfois 4 ou 5 volumes de solution trichloracétique. La solution claire, finalement obtenue, est titrée, en employant une burette au cinquantième de centimètre cube, avec une solution centinormale d'iode, préparée extemporanément par dilution de la solution décinnormale. L'indicateur est le nitroprussiate en liqueur ammoniacale. On inscrit le nombre de cm^3 nécessaires pour que la réaction au nitroprussiate devienne négative (on a le chiffre n).

Puis on additionne la liqueur de 1 ou 2 cm³ (suivant le volume) de réactif de Tromsdorff (empois d'amidon), et on note le nombre de centimètres cubes d'iode centinormal versés pour obtenir une teinte bleue stable, sans oublier de faire intervenir la correction nécessaire¹ (on a le chiffre *n'*).

Sachant que 1 cm³ de solution centinormale d'iode correspond à 3 mg, 07 de glutathion réduit, on calcule les quantités de ce dernier corps en milligrammes pour 100 grammes de tissu frais. Mais on a soin de modifier le chiffre obtenu au moyen de la réaction au nitroprussiate en faisant intervenir une correction (correspondant à 1 mg. par 100 cm³ de liquide d'épuisement). Nous déterminons donc ainsi les deux valeurs *G* et *G'*.

b) Dans le sang. — Le sang est recueilli directement dans une certaine quantité d'acide trichloracétique à 10 pour 100. On dilue ensuite de telle sorte que 5 cm³ du mélange correspondent à 1 cm³ de sang. On filtre immédiatement et le dosage est terminé sur une partie aliquote du filtrat, par la méthode précédente.

2° Dosage du glutathion total.

A 10 cm³ du filtrat trichloracétique précédemment obtenu, on ajoute 1 g. de grenaille de zinc, exempt de toute impureté et en petits fragments, puis 2 cm³ d'acide chlorhydrique pur. On dilue à 15 cm³ avec la solution d'acide trichloracétique à 10 pour 100. Après 15 minutes de contact, on filtre et, sur une partie aliquote du filtrat, on effectue le dosage du glutathion réduit, suivant la méthode de Mme Randoin et René Fabre (334).

1. Afin de connaître la valeur de cette correction, il faut effectuer un essai à blanc en déterminant le nombre de cm³ de solution centinormale d'iode qu'il faut ajouter à de l'acide trichloracétique à 10 p. 100, en présence d'empois d'amidon, pour obtenir le virage au bleu.

CHAPITRE V

**LE GLUTATHION
CHEZ LES ÊTRES VIVANTS**

A peine eut-on entrevu le rôle des dérivés sulfhydrylés dans la respiration tissulaire, que de nombreux auteurs dirigèrent leurs recherches sur la présence de ces corps dans les tissus végétaux et animaux. Les travaux de Gola (114), de Buffa (60), de Heffter (162) et d'Arnold (8) permettaient déjà d'affirmer qu'ils étaient universellement répandus. Il restait à déterminer leur teneur et ses variations. Malheureusement, les diverses méthodes de dosage dont nous avons fait l'exposé et la critique ne conduisent pas à des résultats comparables. Nous en verrons les inconvénients dans les pages qui vont suivre.

Nous examinerons en premier lieu la diffusion du glutathion chez les êtres vivants et ensuite sa répartition dans les tissus.

I. — DIFFUSION DU GLUTATHION CHEZ LES ETRES VIVANTS.

1. Levures et bactéries.

Le glutathion existe dans les organismes considérés comme inférieurs, tels les levures et les bactéries.

Nous avons vu que la levure de bière en renferme des taux variables, ce taux pouvant atteindre de 150 à 200 mg. pour 100 g. de levure fraîche. Pour les bactéries, la recherche de la réaction au nitroprussiate exige des précautions. Il est en effet nécessaire d'éliminer soigneusement le milieu de culture afin de se mettre à l'abri d'interprétations erronées.

Mac Leod et Gordon (247) recherchèrent la présence du glutathion dans diverses cultures. Ils obtinrent une réaction au nitroprussiate positive avec *B. welchii*, *B. tetani*, *B. paratyphosus*, *B. typhosus*, *B. pyocyaneus*, *Vibriosepticus* et *Vibriocholerae*. Par contre, la réaction

fut négative avec les cultures de Staphylocoques, de Streptocoques, de Pneumocoques, de Gonocoques, de Méningocoques, de *B. influenzae*, de *B. de Morax*, de *B. paratyphosus A* et des bacilles dysentériques.

Ces auteurs n'avaient pas éliminé le milieu de culture. Aussi, les résultats qu'ils ont obtenus ne permettent pas de tirer des conclusions précises sur la diffusion des dérivés sulfhydrylés dans les bactéries. Mac Leod et Gordon (247) pensaient d'ailleurs que la substance réagissant avec le nitroprussiate n'était pas produite par la bactérie, mais que celle-ci réduisait le corps existant dans le milieu sous forme de disulfure, le dérivé sulfhydrylé ainsi produit étant utilisé par la bactérie pour accélérer les oxydations nécessaires à son métabolisme.

Callow et Robinson (64) éliminèrent soigneusement le milieu de culture. Ils trouvèrent des réactions au nitroprussiate ammoniacal positives avec *B. alcaligenes*, *B. proteus*, *B. pyocyaneus*, *B. prodigiosus* et *B. fluorescens*. Ils remarquèrent en outre que les bactéries donnant une réaction fortement positive poussaient avec une luxuriance remarquable sur les milieux usuels.

B. sporogenes, *Sarcina aurantiaca*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus acidilactici* ne donnèrent pas de coloration rouge avec le nitroprussiate ammoniacal.

2. Végétaux.

Gola (144), dès 1903, avait mis en évidence l'existence de dérivés sulfhydrylés chez les végétaux. Pour cet auteur, ces dérivés se trouveraient, pour la plus grande partie, dans le méristème. Kozlowski (230) observa que les tissus de réserve et le latex donnaient également une réaction positive avec le nitroprussiate de soude ammoniacal. C'est ainsi qu'il obtint une réaction positive avec les tubercules de *Solanum tuberosum* et avec le latex de *Lactuca sativa*. Mais la réaction fut toutefois plus intense avec des légumineuses telles que *Phaseolus multiflorus*, *Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Vicia faba*, et aussi avec les graines d'Iris, de Fritillaria, de Scilla, de

Papaver, d'Acer, de Melandrium, de Primula, d'Helianthemum.

Joyet-Lavergne (203) mit en évidence la présence de glutathion non seulement chez les Phanérogames (*Viola tricolor*, *Primula officinalis*, *Forsythia fortunei*, *Cheranthus Cheiri*, *Stellaria Holostea*, *Geranium Robertianum*, *Punica granatum* et *Polygonatum multiflorum*), mais aussi chez les Prêles (*Equisetum maximum*, *E. arvense*, *E. limosum*), les Algues (*Fucus vesiculosus*, *F. serratus*, *F. platycarpus*) et les Champignons (*Saprolegnia*).

3. Animaux.

Buffa (60), en 1904, observa que la réaction au nitroprussiate était donnée par certains tissus animaux, et, en 1911, Arnold (8) généralisa cette observation. Hopchez le Ver de terre, l'Huître, la Mouche à viande, l'Ecrevisse, la Raie, la Morue, la Grenouille, et chez tous les Mammifères examinés. Il remarqua que, exception faite pour les muscles, la réaction était beaucoup plus intense chez les animaux à sang froid que chez les animaux à sang chaud.

Shearer (357) observa que le sperme et les œufs de *Echinus miliaris* renfermaient des quantités considérables de glutathion réduit. Plus tard au cours de ses travaux, Joyet-Lavergne trouva du glutathion chez des Protozoaires, tel *Haemoproteus colombae* (203), chez des Grégarines (204), chez *Helix pomatia* et *Bufo vulgaris* (207). Les recherches de Blanchetière et Mélon (51) sur la diffusion du glutathion dans le règne animal apportèrent des renseignements quantitatifs.

Les Cœlentérés, les Echinodermes, les Mollusques, les Annélides, ont des teneurs en glutathion réduit oscillant entre 50 et 70 mg. pour 100 grammes de tissu frais. Les Arthropodes présentent des taux nettement supérieurs. Chez les Poissons, par contre, la teneur est extrêmement faible. Les dosages effectués sur *Gobius flavescens* et *Gobius paganellus* ont donné des taux respectifs de 8 mg. et de 7 mg. 5 pour 100 g., l'analyse ayant porté

sur l'animal total dépouillé des parties squelettiques. Mme Boucher-Firly (56), qui a fait des dosages de glutathion chez quelques Poissons *in toto*, a trouvé également des taux très faibles.

Chez les Mammifères, peu d'auteurs ont entrepris des dosages sur l'animal entier. Cependant, Thompson et Vøgtlin (367) ont trouvé chez le Rat des teneurs voisines de 30 mg. pour 100 g.

Non seulement le glutathion existe dans tous les organismes, mais, dans un organisme donné, on en trouve dans tous les tissus.

II. — REPARTITION DU GLUTATHION DANS LES TISSUS.

Si la répartition du glutathion dans les divers tissus a été souvent étudiée chez les Mammifères, elle a fait l'objet de fort peu de travaux pour le reste du règne animal.

1. Animaux autres que les Mammifères.

Daniel et Doran (83), ayant recherché la présence du glutathion chez *Mytilus edulis*, constatèrent que les muscles adducteurs donnaient une réaction positive qui ne disparaissait que lentement. Le « pied » ne donnait qu'une réaction faible. Le résultat était incertain avec les glandes gastriques, la réaction colorée étant masquée par le pigment naturel. Le « manteau » qui contient les produits reproducteurs femelles donne une réaction positive forte, mais qui s'atténue rapidement.

Joyet-Lavergne (204) observa que, chez le sporadin femelle de *Gregarina polymorpha*, le protomérite était moins riche en glutathion que le deutomérite. Cet auteur nota, d'autre part, un parallélisme remarquable entre la teneur en glutathion dans les différentes régions d'une grégarine et la distribution du chondriome. Les zones cytoplasmiques dépourvues de chondriome ne donnent pas la réaction du glutathion; celles où les éléments du chondriome sont peu abondants donnent une réaction faible et celles où le chondriome est le plus abondant

donnent une réaction plus forte. Chez d'autres organismes, il trouva une superposition exacte des images mitochondriales avec celles données par la répartition du glutathion. Il conclut que, dans la cellule, le chondriome est le support du glutathion.

Giroud (137) discuta cette conclusion. Il montra qu'au niveau des fibres cristalliniennes, la réaction au nitroprussiate était très intense et qu'on avait ainsi le moyen de reconnaître une localisation si elle existait. Or, on n'en observe pas. La coloration est diffuse. D'autre part, certains éléments sans chondriome, tels les globules rouges, renferment du glutathion en quantité notable. Enfin, il n'y aurait pas de rapports quantitatifs entre le glutathion et le chondriome, car il y a beaucoup moins du premier dans les cellules d'un méristème, cependant plus riche en mitochondries, que dans les cellules adultes qui en dérivent.

Quoi qu'il en soit, et s'il est difficile d'affirmer que tel constituant cellulaire est le support du glutathion, on constate que la presque totalité des cellules renferme des dérivés sulfhydrylés. Ce taux, éminemment variable d'une cellule à l'autre, est généralement en rapport étroit avec l'activité du métabolisme du tissu envisagé.

Les taux de glutathion des divers organes donnés par les différents auteurs qui ont étudié la répartition de ce composé sont difficilement comparables entre eux. Les résultats varient, nous l'avons vu précédemment, avec la méthode de dosage utilisée et, de plus, certains chiffres ont été obtenus en considérant le glutathion comme un dipeptide de poids moléculaire 250, alors que d'autres auteurs ont pris pour base le poids moléculaire 307 du tripeptide.

2. Mammifères autres que l'Homme.

Chez le Rat, Thompson et Vøegtlin (367) trouvèrent des teneurs en glutathion oscillant autour de 25 mg. dans les muscles, de 100 mg. dans le cerveau et le rein et atteignant 200 mg. dans le foie. Ces auteurs constatèrent le fait, retrouvé constamment depuis, que les variations individuelles étaient notables. Ils recherchèrent le glutathion sanguin et constatèrent que le sérum

n'en contient pas et que les hématies en renferment des taux variables suivant les animaux : 55 mg. chez le Chien, 46 mg. chez le Rat, 104 mg. chez le Lapin et 153 mg. chez le Cobaye. Le sang veineux paraît plus riche que le sang artériel.

Buffa (60), en 1904, avait noté que la peau donne une réaction positive avec le nitroprussiate. Walker (404) fit la même observation, et Madge Kaye (214) constata que si l'épiderme (sauf le stratum corneum), le follicule pileux, la racine et la partie immédiatement sus-jacente de celle-ci donnent une réaction intense, les cellules voisines des glandes sébacées et sudoripares, ainsi que les papilles dermiques, ne donnent qu'une coloration rose pâle. Les poils colorés sont plus riches que les poils blancs, la quantité de glutathion diminuant avec la vitalité du poil. Binet, Verne et Arnaudet (36) observèrent avec la peau des lapins normaux une réaction rose très intense au niveau du bulbe pileux, et une réaction plus pâle au niveau du corps muqueux de l'épiderme.

Giroud et Bulliard (141), étudiant le corps muqueux de la châtaigne du Cheval et de la corne des Bovidés, trouvèrent des taux de glutathion de 100 à 118 mg. pour le premier et de 145 à 150 mg. pour le second.

Watrin (407) nota également une réaction au nitroprussiate positive dans des mamelons de Cobaye normalement pigmentés.

Blanchetière et Binet (40) trouvèrent que, chez le Chien, le foie était le tissu le plus riche et que, si on classait par ordre de teneur décroissante les divers organes, ils se rangeaient de la façon suivante : foie, rein, rate, muscle et poumon. La teneur du muscle cardiaque est plus élevée que celle des muscles squelettiques. Tsubura (371), en 1925, avait déjà trouvé que les muscles lisses étaient plus riches en glutathion que les muscles striés, et ce résultat semble se retrouver chez tous les Mammifères.

Mme Randoin et René Fabre (333) trouvèrent chez le Pigeon une teneur plus forte dans le foie que dans les divers muscles et que dans le sang.

Delore (87) trouve que, chez le Cobaye et le Bœuf, le foie est plus riche en glutathion que divers autres organes. En résumé, quels que soient les animaux considérés, on retrouve toujours les faits suivants :

1° Dans le sang, le glutathion est localisé dans les hématies, à l'exclusion du sérum qui ne contient pas de dérivés sulfhydrylés;

2° Les variations individuelles sont importantes;

3° Le foie semble être l'organe le plus riche en glutathion.

Ce dernier point n'est cependant pas rigoureusement exact; Blanchetière et Binet (42), ayant recherché la teneur en glutathion réduit de quelques glandes du Chien, constatèrent leur richesse considérable en dérivés sulfhydrylés, la surrénale étant à ce point de vue particulièrement remarquable. Binet et Giroud (34) constatèrent en outre que si la surrénale était l'organe le plus riche en glutathion, la substance corticale avait elle-même une teneur beaucoup plus forte que la médullaire. Chez le Cobaye jeune, c'est la partie la plus interne de la zone corticale, la zone réticulée, qui donne la réaction du glutathion la plus intense.

Houssay et Mazzocco (185) trouvèrent que, chez le Rat blanc, la surrénale était également l'organe le plus riche en glutathion. Hirsch (171) devait trouver un résultat analogue chez le Lapin.

Lors du dosage du glutathion dans les divers tissus du Cobaye, nous avons fait des constatations analogues. De plus, ayant effectué non seulement le dosage du glutathion réduit, mais aussi celui du glutathion oxydé, nous avons remarqué que, si le taux du glutathion oxydé est très faible dans les différents organes, il n'en est pas de même dans les glandes endocrines. L'étude du rapport $\frac{\text{glutathion réduit}}{\text{glutathion total}}$ est particulièrement suggestive.

DOSAGE DANS LES ORGANES DU COBAYE
DU GLUTATHION RÉDUIT ET DU GLUTATHION OXYDÉ

ORGANES PRELEVES	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port G-SH GT
	G	G'	G	G'	G	G'	
Fôie	167	289	178	301	11	12	0,96
Reins	141	213	142	215	1	2	0,99
Cœur	83	130	85	134	2	4	0,97
Muscles de l'abdomen	26	41,7	27	41,7	1	0	1
Ovaires	182	238	318	397	136	159	0,75
Testicules	141	220,5	168	256	27	35,5	0,86
Surrénales	303	460	548	789	245	329	0,58
Thyroïdes	192	384	358	575	166	191	0,67
Rate	235	346	241	354	6	8	0,97
Poumons	102	156,5	102,5	157,5	0,5	1	0,99
Cerveau	65,5	104	72	112	6,5	8	0,92
Sang	41	64,5	53	80,2	12	15,7	0,80

Le glutathion est exprimé en milligrammes pour 100 grammes d'organes.

Les résultats indiqués dans ce tableau sont les moyennes des différents dosages effectués. Il convient de noter que les teneurs en glutathion varient relativement peu, pour le même organe, chez les différents Cobayes examinés. Font cependant exception les ovaires et les testicules, pour lesquels les variations individuelles sont considérables. On peut penser que ces variations sont en rapport avec l'état physiologique de ces organes : activité ou repos.

Nous avons repris sur le Chien les essais effectués

sur le Cobaye. Nous avons trouvé des résultats concordants. Nous les résumons dans le tableau ci-dessous.

DOSAGE, DANS LES ORGANES DU CHIEN,
DU GLUTATHION RÉDUIT ET DU GLUTATHION OXYDÉ

ORGANES PRELEVES	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port G-SH
	G	G'	G	G'	G	G'	GT
Foie	212,8	298,4	216,3	306	3,5	7,6	0,98
Reins	158	212,6	158,9	214,8	0,9	2,2	0,99
Muscles de l'abdomen	46,2	61	46,4	61,8	0,2	0,8	0,69
Rate	149,1	190,5	160,6	210,8	11,5	20,3	0,99
Sang	32	40,8	41	53,4	9	12,6	0,92
Surrénales	354,5	465	480,2	690	145,7	225	0,77
Thyroïde	278,9	327,5	451,7	582,5	172,8	265	0,61

Ces résultats, pour le Cobaye comme pour le Chien, représentent la moyenne de nombreux dosages; ils montrent, non seulement l'interdépendance qui lie les glandes endocrines et le glutathion, mais ils sont, à notre avis, une indication de l'importance du rapport : $\frac{\text{G-SH}}{\text{GT}}$

Ce rapport est, selon nous, intimement lié à l'action du glutathion. Ce n'est pas tant le taux du glutathion des divers organes qu'il est intéressant de connaître, que cet état d'équilibre nécessaire, dans l'organisme, entre le glutathion réduit et le glutathion oxydé; or, le rapport $\frac{\text{G-SH}}{\text{GT}}$ est le reflet de cet équilibre. Ce fait, qui se dégage de nos recherches et sur lequel nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir, nous paraît primordial dans l'action physiologique du glutathion.

3. Homme.

Nous n'avons que fort peu de chiffres se rapportant à l'Homme. Nous savons, en effet, que le pouvoir réducteur du glutathion diminue rapidement dans les tissus cadavériques. C'est un obstacle sérieux aux recherches de pathologie humaine, quoique cependant la réfrigération s'oppose d'une façon très notable à ce phénomène, ainsi que l'ont montré Morel et Delore (310). Ces auteurs ont cherché le taux du glutathion dans la rate humaine après splénectomie; ce taux est de 150 mg. pour 100 g. d'organe. Dans les muscles de la jambe, Delore a trouvé 40 mg. Ces teneurs se rapprochent de celles trouvées chez les divers Mammifères, tout en étant toutefois plus faibles. Léo Lira (248) trouva dans le placenta une teneur moyenne de 30 mg. Lemeland et Delétang (244) devaient retrouver des teneurs voisines. Ces auteurs ont, d'autre part, effectué des dosages de glutathion dans les divers organes du fœtus humain. Mais on ne peut évidemment pas en déduire les teneurs existant chez l'adulte. Toutefois, on remarque là encore que les chiffres trouvés sont nettement inférieurs à ceux observés chez les autres Mammifères. La glutathionémie est de même, chez l'Homme, inférieure à celle trouvée dans les diverses espèces animales. Ce fait serait contrôlé par les valeurs de la thiémie, trouvées également plus faibles chez l'Homme par Parhon et Cahane (320).

Dans le sang, le taux du glutathion réduit, indiqué par les différents auteurs, varie avec la méthode employée, et voici quelques chiffres qui indiqueront combien cette diversité des méthodes de dosage est regrettable. D'après Gabbe (131), la glutathionémie chez le sujet normal varie entre 29 et 37 mg. pour 100 cm³ de sang. Kitamura (229) a indiqué comme limites extrêmes 18 et 32 mg.; le taux est plus élevé pour Varela (377) et ses collaborateurs et varie de 40 à 56 mg. D'après Campanacci (65), par contre, la teneur n'est que de 16 mg. Labbé et Nepveux (235) trouvent de 15,6 à 25 mg.

Les dérivés sulfhydrylés sont, comme dans les autres espèces animales, localisés exclusivement dans les globules, le plasma ne contenant pas de glutathion. Achard, Jeanne Lévy et Guthmann (5) ont constaté qu'il en était de même des liquides pleuraux, d'ascite, d'œdème, d'hydrothorax.

Les dérivés sulfhydrylés se trouvant localisés dans les hématies, il peut être intéressant de connaître non seulement la teneur du sang en glutathion réduit et en glutathion oxydé, mais aussi les variations de ces teneurs comparativement au nombre d'hématies et à leur teneur en hémoglobine. Nous verrons, lors de l'étude des variations pathologiques du glutathion, combien la connaissance de ces divers rapports est utile. Achard, Jeanne Lévy et Guthmann (5) donnent les chiffres suivants : la moyenne des teneurs en glutathion réduit étant de 42 mg. 74 et celle des teneurs en glutathion total étant de 62 mg. 81, le rapport

$$\frac{\text{GR}}{\text{GT}} = 0,68 \qquad \frac{\text{GO}}{\text{GR}} = 0,46$$

En outre, ces auteurs ont trouvé, en faisant la moyenne chez 13 sujets :

$$\frac{\text{Teneur en GSH, en mg. pour } 100 \text{ cm}^3}{\text{Millions d'hématies par mm}^3} = 9,8$$

les chiffres extrêmes étant : 8,6 et 11,4.

Gabbe (131) avait dès 1929 établi ce rapport et constaté qu'il variait à l'état normal de 5,3 à 9,3. Pour Varela et ses collaborateurs (377), il est voisin de 9,4, alors que pour Campanacci (65) il ne serait que de 4.

Nous voyons combien il faut être prudent dans l'interprétation des taux de la glutathionémie, ces taux étant sujets non seulement à de larges variations individuelles, mais aussi à des écarts dus à la méthode de dosage utilisée.

Nous essaierons cependant, afin d'éclaircir le rôle des dérivés sulfhydrylés, de rechercher si la glutathionémie varie avec les facteurs biologiques : croissance, sexe..., si les états pathologiques influent sur son taux et enfin si, expérimentalement, on arrive à modifier la teneur du glutathion.

CHAPITRE VI

FACTEURS DE VARIATION DU TAUX DU GLUTATHION

Facteurs physiologiques de variation du taux du glutathion

Les circonstances exactes dans lesquelles ont été effectués les dosages des dérivés sulfhydrylés lors de l'étude de la répartition de ces composés n'ayant pas été rigoureusement fixées, on peut se demander si des variations de condition, altitude, régime, paraissant sans grande importance, n'ont pas pu être une des causes des différences énormes observées dans les résultats des divers auteurs.

C'est ainsi qu'un changement d'altitude peut entraîner des modifications importantes de la glutathionémie, et Delrue et Vischer (88) observèrent, au cours d'un séjour à une haute altitude, une augmentation du taux de glutathion sanguin qui ne peut s'expliquer par la seule élévation du nombre des globules rouges. Durant un séjour à 3.460 m., la concentration du glutathion sanguin est doublée par rapport à la concentration déterminée à basse altitude. A une altitude élevée, la valeur moyenne de la glutathionémie était de 51 mg. 6, les chiffres extrêmes étant 47 mg. 5 et 58 mg. 2, tandis qu'à basse altitude la valeur moyenne n'est que de 23 mg. 5, avec les valeurs extrêmes 16 mg. 2 et 35 mg.

Evidemment, il est rare d'effectuer des dosages à une altitude de 3.460 m., et nous ne supposons pas que les auteurs qui ont recherché la localisation du glutathion

aient fait des titrages à une telle altitude sans le mentionner. Mais des hauteurs moins impressionnantes sont peut-être susceptibles d'apporter des modifications de la glutathionémie.

1. Influence du régime sur les teneurs en glutathion.

Uyei (376), en 1926, étudiant la répartition du glutathion dans les différents organes du Lapin, du Rat, du Chien et du Cobaye, fit des essais chez l'animal à jeun et non à jeun. Les résultats qu'il obtint sont assez peu dissemblables; d'une façon générale, les taux semblent plus faibles chez les animaux à jeun que chez les autres; toutefois, les glandes endocrines, surrénales et testicules semblent avoir une teneur légèrement plus élevée chez l'animal à jeun. Tatsuzawa (366) devait retrouver ce fait et, après un jeûne de trois jours, il constatait chez le Lapin une augmentation du taux du glutathion dans les surrénales.

Blanchetière et Binet (42), vers la même époque, recherchèrent l'influence du régime sur la teneur en glutathion des différents organes du Chien. Ils soumirent des animaux à des régimes exclusifs, puis les sacrifièrent au bout de six jours. La teneur en glutathion des divers organes ne différait pas sensiblement de celle du Chien normal et normalement nourri. Toutefois, à la suite d'une alimentation exclusivement grasse, le taux du glutathion du foie et des reins était légèrement augmenté.

Si ces résultats ne sont pas décisifs et ne permettent pas d'établir une relation entre le régime et les teneurs en glutathion, il en est tout autrement si l'on considère des modifications plus profondes du régime. En particulier, l'étude des taux de glutathion des organes, au cours de l'avitaminose B, a permis à Mme Randoïn et René Fabre, non seulement de constater des variations dans la teneur en dérivés sulfhydrylés des tissus, mais d'en tirer des conclusions fort intéressantes. Abderhalden et Wertheimer (1) ont mis en évidence dans l'avitaminose B un ralentissement des processus de réduction. Ces auteurs, après avoir dosé le carbone, l'azote et le

soufre dans divers tissus et trouvé des chiffres voisins chez des Pigeons normaux et des Pigeons carencés, en conclurent que la teneur en cystine est sensiblement la même dans les deux cas. Ils constatèrent toutefois que le taux de cystéine déterminé colorimétriquement était très nettement diminué chez les Pigeons privés de vitamines B, et les muscles de ces derniers ne possèdent aucune action réductrice sur la cystine.

Devant ces faits, Mme Randoïn et René Fabre (333) pensèrent qu'une relation pouvait exister entre la teneur en glutathion des tissus du Pigeon et le manque exclusif de vitamines B. Ils firent alors une série d'expériences afin de mettre en relief cette relation. Ils soumirent un lot de Pigeons à un régime artificiel renfermant tous les principes indispensables en proportions convenables, à l'exception des vitamines B, et déterminant par conséquent inévitablement la polynévrite aviaire. Les animaux étaient sacrifiés à des périodes variables. Les organes étaient prélevés immédiatement après la mort des animaux et les dosages de glutathion effectués aussitôt.

Ils ne constatèrent aucun changement notable chez le Pigeon privé de vitamines B, sacrifié les premiers jours de la maladie. Du 10^e au 15^e jour de la maladie, lorsque s'établissent les paralysies et les troubles digestifs et que la température centrale commence à baisser, le taux du glutathion diminue légèrement dans les muscles et le cœur. Enfin, quand les animaux commencent à présenter de graves symptômes, les auteurs notèrent une importante diminution de la teneur en glutathion des muscles squelettiques et du muscle cardiaque. Grâce à leur important travail, Mme Randoïn et René Fabre (333) purent établir une relation entre la diminution de la teneur en glutathion des muscles squelettiques et le manque exclusif de vitamines B dans un régime. Si on rapproche ces constatations de cet autre fait non moins caractéristique que, en l'absence de vitamines B, les glucides ne semblent plus être utilisés comme source d'énergie par défaut d'un moyen de réaliser normalement la combustion du glucose, il semble que les résultats des auteurs présentent un intérêt réel pour l'étude des phénomènes biologiques d'oxydation-

réduction. Mme Randoin et René Fabre (335) généralisèrent leurs résultats. L'absence de vitamines B déterminerait dans le tissu musculaire du Rat, comme dans celui du Pigeon, une baisse de la teneur en dérivés sulphydrylés.

Ces résultats furent en partie confirmés par Collazo et Pi-Suñer Bayo (77), qui trouvèrent chez des Pigeons nourris de riz décortiqué, donc en avitaminose B, une hypoglutathionémie, le taux passant de 71 mg. 9 chez l'animal normal à 58 mg. 9 pour 100 cm³ de sang chez l'animal carencé. Inversement, Labbé, Nepveux et Gringoire (236) donnèrent à des Lapins de la vitamine B. Les animaux furent sacrifiés après environ un mois de traitement. Des dosages de glutathion effectués dans le foie montrèrent une augmentation du composé d'environ 30 pour 100. Chez les animaux témoins, la teneur est de 243 mg. pour 100 g. de foie, alors qu'après traitement vitaminique, la teneur en glutathion est en moyenne de 317 mg.

Dans un tout autre ordre d'idées, Mélon (299) a recherché l'influence d'une alimentation riche en cystine sur le glutathion des tissus. Les Rats recevaient une dose journalière de 50 mg. de cystine. Seule la teneur en glutathion du tissu hépatique était plus élevée chez les Rats traités que chez les Rats normaux.

La cystine a, de toute évidence, une influence sur la teneur en glutathion des tissus. Laclau et Marenzi (237), ayant donné à un lot de Rats le régime 324 de Sherman et à un second lot ce même régime additionné de cystine, constatèrent qu'alors que les Rats à régime complet ont une teneur en glutathion hépatique de 55 à 108 mg. pour 100 g. de tissu et en glutathion musculaire de 9 à 22 mg., les Rats soumis au régime additionné de cystine ont des teneurs de 91 à 144 mg. pour le glutathion hépatique et de 14 à 24 mg. pour le glutathion musculaire.

Plus récemment, Marenzi et Braier (290) recherchèrent l'effet d'un régime déficient en cystine sur le glutathion des tissus. Un certain nombre de Rats de 2 mois pesant de 30 à 60 grammes furent répartis en trois lots. Le premier lot reçut un régime pauvre en cystine. La mortalité fut très forte, et le taux du glutathion total des

organes fut inférieur de 25 p. 100 au taux trouvé chez les animaux du second lot recevant un régime normal. Quant aux Rats du troisième lot qui recevaient un régime riche en cystine, leurs organes ne montrèrent pas d'augmentation nette du glutathion total.

Baumann et Deschwanden (16), ayant dosé le glutathion dans le sang de 662 soldats âgés de 20 à 25 ans, trouvèrent des taux moyens de 25 à 32 mg., les teneurs maxima étant de 40 à 50 mg.

Ils tentèrent, par addition de levure de bière au régime, d'élever chez tous les soldats la glutathionémie jusqu'à ces taux maxima. Mais les résultats ne furent pas concluants.

2. Le glutathion et la croissance.

La teneur en glutathion des organes varie-t-elle avec la croissance de l'individu?

Shearer (357), dès 1922, étudiant les phénomènes de la fécondation chez *Echinus miliaris*, trouva que seules les gonades mûres contenaient du glutathion. De plus, si le spermatozoïde et l'œuf contiennent à l'état de maturité une quantité appréciable de glutathion réduit, dans l'œuf, une minute après la fertilisation, le taux est beaucoup plus élevé. Il est possible que le glutathion existe dans l'œuf et le spermatozoïde, sous la forme oxydée, et qu'au moment de la fertilisation, il passe sous la forme réduite.

Mme Boucher-Firly (56) trouva chez les jeunes Anguilles que la teneur en glutathion *in toto* diminuait à mesure que l'Anguille serait plus avancée dans son développement. Chez des Civelles d'eau douce, le taux du glutathion est de 19 mg. 48; chez l'Anguille, il n'est plus que de 10 mg. De même, chez les Civelles d'eau de mer, la teneur en dérivés sulfhydrylés est de 24 mg. 75, tandis que, chez l'Anguille, elle n'est plus que de 16 mg. 55.

Thompson et Vægtlin (367) étudièrent chez le Rat la teneur en glutathion en fonction de l'âge. Ils constatèrent que le taux des dérivés sulfhydrylés décroît au fur et à mesure de la croissance de l'animal. C'est ainsi que le dosage effectué *in toto* dans un embryon de 0 g. 068 à 0 g. 0811 donne une teneur en glutathion de 60 mg.

pour 100 g. Elle passe progressivement à 44 mg. pour un embryon de 3 g. 895 à 4 g. 667, puis à 35 mg. à la naissance, alors que le Rat pèse de 4 g. 646 à 4 g. 960, et enfin à 23 mg. pour un Rat de 137 à 170 g.

Chez l'Homme, peu de dosages ont été effectués afin de se rendre compte de la modification du taux des dérivés sulfhydrylés avec l'âge. Toutefois, Nitzulescu et Ornstein (316) recherchèrent la glutathionémie chez les vieillards. Le taux du glutathion sanguin a varié chez les sujets de moins de 50 ans entre 32 mg. 2 et 50 mg. pour 100 avec une moyenne de 39 mg. 5.

Chez les sujets âgés, cette teneur a varié entre 26 mg. 9 et 42 mg. 7 avec une moyenne de 37 mg. 58.

En tenant compte des variations individuelles de la glutathionémie, on ne peut pas considérer ces petites variations comme significatives.

3. Le glutathion et l'état sexuel.

La teneur en glutathion des divers organes variant suivant leur plus ou moins grande activité physiologique, il semble indiqué de rechercher si la teneur en glutathion du sang ou des tissus dépend de l'état sexuel, cet état ayant une influence notable sur le métabolisme de l'individu.

Dès 1924, Joyet-Lavergne (196) avait remarqué le rapport existant entre la sexualisation et le rH^2 intracellulaire. Des études entreprises sur divers organismes : Phanérogames, Prêles, Algues et Protozoaires, lui avaient permis de constater que, dans une espèce, les cellules polarisées dans le sens femelle avaient un rH^2 inférieur à celui des cellules polarisées dans le sens mâle. Après une étude plus approfondie du phénomène, il constata que les dérivés sulfhydrylés jouaient un rôle actif dans la valeur du rH^2 qui augmente lorsque la teneur en glutathion d'un organe ou d'un tissu diminue. Il conclut que la teneur en glutathion est un caractère de sexualisation du cytoplasme.

Retrouve-t-on une telle influence de l'état sexuel sur les taux de glutathion ?

Il semble que l'on puisse, au moins en ce qui concerne les Oiseaux, répondre par l'affirmative, grâce à l'étude systématique entreprise par Chanton (71), qui expérimenta sur les Gallinacés et en particulier sur le Coq et la Poule. Ces animaux se prêtent remarquablement bien aux études concernant la sexualité, et ce pour deux raisons : d'abord l'existence de caractères sexuels secondaires particulièrement nets causant un dimorphisme sexuel accentué, ensuite la réalisation possible d'un type neutre intermédiaire entre le mâle et la femelle. Chez les Gallinacés normaux, la glutathionémie est beaucoup plus basse chez la Poule que chez le Coq. Chanton (71) put étendre ses résultats aux Canards. Binet et Gley (35) constatèrent le même fait chez le Pigeon où la différence atteint 32 p. 100 en faveur des mâles. Si les glandes génitales sont enlevées, on voit très rapidement la teneur en glutathion varier dans de fortes proportions. La glutathionémie semble alors se stabiliser autour d'une valeur moyenne identique, qu'il s'agisse de Chapons d'origine mâle ou de Chapons d'origine femelle (72). On retrouve cette même valeur moyenne chez des animaux intersexués, ayant par suite des gonades mixtes. Si, enfin, on change l'état sexuel d'un animal castré, par l'établissement d'une greffe hétérologue, on voit s'établir la glutathionémie caractéristique du sexe auquel appartiennent les gonades greffées et reprises. C'est ainsi que, chez une Poule masculinisée après castration, grâce au développement de l'ébauche droite en testicule, on voit corrélativement à l'évolution de sa crête sa glutathionémie passer de 44 mg. 37, chiffre obtenu alors que l'animal était encore femelle, à 110 mg. 60 pour 100 cm³ de sang.

Inversement, un Coq castré, puis ayant subi une greffe d'ovaire, montre, parallèlement à la régression de sa crête et à l'apparition du plumage femelle, une évolution du taux du glutathion sanguin qui, de 78 mg. 86, descend à 38 mg. 91. Le rôle primordial des glandes génitales sur la glutathionémie a donc été nettement mis en évidence. Le rapport entre le glutathion et la sexualité semble être remarquablement étroit, du moins chez les Gallinacés, et Chanton et Caridroit (73) ont montré que, dans

la race Sebright, où les Coqs ont normalement le plumage de la Poule, la glutathionémie était semblable dans les deux sexes.

Chez les Mammifères, la question se présente avec beaucoup moins de netteté, ce qui tient peut-être à ce qu'aucune étude systématique n'a été entreprise. Les auteurs ne mentionnent pas généralement de différences dans la glutathionémie, suivant le sexe.

Nous avons eu, au cours de nos expériences, l'occasion de rechercher la glutathionémie d'un certain nombre de Chiens, et on peut noter les chiffres suivants :

Chiens : 42 mg. 66, 39 mg. 74, 43 mg. 48, 38 mg. 29,
41 mg. 98, 37 mg. 57, 43 mg. 21, 36 mg. 84,
soit en moyenne 40 mg. 47;

Chiennes : 44 mg. 72, 49 mg. 18, 48 mg. 34, 49 mg. 94,
49 mg. 86, 46 mg. 58, 49 mg. 19, 50 mg. 27,
soit en moyenne 49 mg. 63.

Evidemment, ces chiffres sont moins suggestifs que ceux obtenus par Chanton (71) chez les Gallinacés et, en tenant compte des variations individuelles, il est difficile d'en tirer une conclusion certaine. En tout cas, cette étude pourrait être reprise en notant exactement l'état sexuel de l'animal (Chienne au repos ou en rut), et peut-être verrait-on dans certaines conditions la différence s'accroître.

Villela et Campos (388) dans le sang humain n'ont pas trouvé de différence notable suivant le sexe; cependant, là encore, on note une glutathionémie légèrement plus forte chez la Femme que chez l'Homme. Si on ne considère plus le sang, mais l'organe génital, on observe des teneurs en glutathion qui ne sont pas nettement dissimilaires. Blanchetière et Binet (40), lors de leurs recherches sur la teneur en glutathion des divers organes du Chien, ont trouvé un taux de 260 mg. pour 100 g. de testicule et de 233 mg. pour 100 g. d'ovaire. Chez le Cobaye, nous avons trouvé des taux plus élevés dans les ovaires que dans les testicules; mais nous avons noté déjà précédemment que ces taux étaient éminemment variables, les variations individuelles dépassant de beaucoup celles

qu'on observe habituellement pour les autres organes.

En particulier, le rapport $-\frac{\text{GSII}}{\text{GT}}$ passe de 0,60 à 1. Ces variations semblent être en rapport avec l'état sexuel qui retentirait ainsi sur le taux de glutathion des glandes génitales. La castration, qui, chez le Coq, s'accompagne d'une modification de la glutathionémie, n'a aucune action chez le Chien mâle. L'ovariotomie, par contre, est suivie d'une chute nette du glutathion des divers organes. Blanchetière, Binet et Arnaudet (44) ont observé que, dix mois après l'ovariotomie d'une Chienne, le dosage du glutathion effectué dans divers organes donnait des chiffres faibles; le taux des dérivés sulfhydrylés qui, normalement, est voisin de 482 mg. pour 100 g. de surrénales, était tombé à 327 mg., soit une diminution de 30 p. 100 environ. Il semble y avoir là une relation de cause à effet assez probante et on peut penser qu'il existe un rapport entre l'état sexuel et la glutathionémie qui, pour n'être pas superposable à celui qui existe chez les Gallinacés, n'en est pas moins réel.

Au cours de nos essais, nous avons recueilli un argument supplémentaire à l'existence de ce rapport. Lors de l'administration de glutathion à de jeunes Rats, nous avons constaté que ces animaux perdaient du poids par rapport aux témoins. A l'autopsie, nous avons pesé les divers organes et nous avons constaté que, si tous ceux des animaux traités avaient un poids inférieur à ceux des témoins, il en était tout autrement des testicules qui présentaient le rapport inverse. En outre, le glutathion dosé dans les différents tissus nous a permis de constater un fait superposable, à savoir que les testicules des animaux traités avaient une teneur en dérivés sulfhydrylés supérieure à ceux des animaux témoins. Voici le détail de l'expérience.

Quatre Rats mâles, d'une même portée, ont été répartis en deux groupes. Deux Rats ont reçu en chaque jour, du 19 juin au 12 juillet, une injection sous-cutanée d'une solution de glutathion correspondant à 0 g. 025 de ce

composé. Les deux autres Rats ont été élevés dans des conditions identiques, mais n'ont reçu aucune injection. Ces quatre Rats ont été sacrifiés le 12 juillet par prise de sang au cœur. Voici, résumés dans un tableau, les poids des animaux et de leurs organes.

POIDS DES DIFFÉRENTS ORGANES DE RATS
AYANT REÇU DES INJECTIONS DE GLUTATHION

	Poids en grammes	
	2 Rats témoins	2 Rats injectés
Poids initial des 2 Rats	72	72
Poids des 2 animaux à la fin de l'expérience	163	137
Poids des foies	6,267	4,987
Poids des poumons	1,550	1,227
Poids des testicules	3,320	3,661
Poids des cœurs	0,830	0,635
Poids des reins	1,627	1,294
Poids de la rate	0,825	0,400
Poids des yeux	0,355	0,357

Nous avons dosé le glutathion des foies et des testicules des animaux traités et des témoins, en utilisant la technique décrite précédemment.

TENEUR EN GLUTATHION

	Rats témoins		Rats injectés	
	G	G'	G	G'
Glutathion réduit des foies en mg. pour 100 g.	188	230	197,4	239
Glutathion réduit des testicules en mg. pour 100 g.	151,5	199	203,6	254

Cet essai n'ayant été fait que sur un nombre restreint d'animaux, nous avons refait une expérience comparable sur huit Cobayes partagés en deux séries. La première a reçu, à partir du 27 septembre, une injection sous-cutanée de 1 cm³ de solution de glutathion telle que ce cm³ correspond à 0 g. 10 du composé. La deuxième série recevait dans les mêmes conditions un cm³ de soluté physiologique identique à celui dans lequel le glutathion est dissous. Les animaux ont été sacrifiés le 11 octobre.

Voici le résumé des résultats obtenus.

POIDS EN GRAMMES DES ORGANES DE COBAYES
AYANT REÇU DES INJECTIONS DE GLUTATHION

	Série II (témoins)				Moyenne des 4 témoins	Série I (animaux traités)				Moyenne des 4 animaux traités
	1	2	3	4		1	2	3	4	
Poids initial...	194	204	206	194	199,5	192	204	194	197	197
Poids à la fin de l'essai	207	215	229	221	218	185	201	193	189	192
Poids du foie...	12,221	12,176	12,375	13,002	12,493	11,217	12,103	11,807	11,909	11,759
- du poumon...	1,588	1,602	1,695	1,594	1,612	1,492	1,487	1,475	1,603	1,514
- des testicules	1,036	1,157	1,063	1,169	1,106	1,171	1,203	1,212	1,198	1,196
- du cœur.....	0,831	0,814	0,799	0,849	0,823	0,796	0,812	0,820	0,773	0,800
- des reins.....	1,706	1,607	1,518	1,718	1,637	1,573	1,605	1,594	1,618	1,597
- de la rate....	0,712	0,683	0,749	0,786	0,732	0,522	0,501	0,613	0,418	0,513
- des yeux.....	0,322	0,321	0,324	0,319	0,321	0,321	0,320	0,321	0,320	0,3205

Nous avons, comme dans l'essai précédent, dosé le glutathion dans quelques organes.

Nous l'avons non seulement dosé sous la forme réduite, mais nous avons aussi recherché le taux du glutathion total; les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

TENEUR EN GLUTATHION DES ORGANES DE JEUNES COBAYES
AYANT REÇU DES INJECTIONS DE GLUTATHION

ORGANES PRÉLEVÉS	ANIMAUX TÉMOINS						
	GLUTATHION RÉDUIT		GLUTATHION TOTAL		GLUTATHION OXYDÉ		RAPPORT G - SH GT
	G	G'	G	G'	G	G'	
Foie	198	344,5	216,1	344,3	18,1	26,8	0,91
Reins	133	208,2	133,9	210	0,9	1,8	0,99
Cœur	79	126,8	79,9	128,4	0,9	1,6	0,99
Sang	40,2	65,6	51	77,5	10,8	11,9	0,76
Testicules	152	231,6	235	313,1	83	81,5	0,64

ORGANES PRÉLEVÉS	ANIMAUX TRAITÉS						
	GLUTATHION RÉDUIT		GLUTATHION TOTAL		GLUTATHION OXYDÉ		RAPPORT G - SH GT
	G	G'	G	G'	G	G'	
Foie	198,7	321,6	219	349,1	20,3	27,5	0,90
Reins	131,6	204,7	133,6	207	2	2,3	0,98
Cœur	77,9	127,3	78,6	128,5	0,8	1,2	0,98
Sang	39,8	63,7	50,9	78,6	11,1	14,9	0,78
Testicules	171,6	256	274,4	363	102,8	107	0,62

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les Rats et tendent à prouver que si l'état sexuel a une

influence sur le taux du glutathion, il est possible que, réciproquement, l'administration de glutathion ait un certain retentissement sur les organes génitaux.

4. Glutathion et gravidité.

La gravidité peut être considérée à la fois comme un état biologique particulier et comme un état sexuel. L'étude de la glutathionémie semble donc intéressante. Blanchetière, Binet et Arnaudet (44) ont noté que, chez la Chienne, la gravidité déclenche une forte élévation du taux du glutathion des glandes surrénales qui atteint alors 700 à 800 mg. pour 100 g. de tissu.

Plus récemment, Lemeland et Delétang (246) ont étudié la teneur en glutathion réduit de l'utérus gravide et ont constaté qu'elle était beaucoup plus considérable que celle notée jusqu'ici dans les muscles. Dès le début de la gestation, la teneur en glutathion de l'utérus augmente et est alors comparable à celle des capsules surrénales. Ce taux croît considérablement à mesure qu'on se rapproche du terme et arrive à dépasser le taux des capsules surrénales. L'utérus, au début du travail, apparaît comme un des organes les plus riches en glutathion.

Cette augmentation du glutathion n'est toutefois pas en rapport avec une augmentation parallèle de la glutathionémie qui ne semble pas être modifiée durant la gestation. L'accouchement normal ou l'avortement provoqué amènerait toutefois, d'après les mêmes auteurs (243), une chute du glutathion réduit qui commencerait au début du travail et se terminerait quelques jours après l'expulsion du fœtus.

Il semble donc bien exister un rapport entre l'état biologique d'un individu et la teneur en glutathion de son sang ou de ses organes. Ceci n'a rien qui puisse nous surprendre.

En effet, en étudiant la répartition du glutathion, nous avons constaté que la teneur des divers tissus variait suivant l'activité de l'organe envisagé; il est donc normal que, lorsque cette activité se modifie, on trouve des changements dans le taux et la répartition du glutathion.

5. Le glutathion et les glandes endocrines.

Nous avons vu, lors de l'étude de la répartition du glutathion, que les glandes endocrines étaient plus riches en glutathion que tous les autres organes. De plus, nous avons pu mettre en évidence que le rapport

$$\frac{\text{Glutathion total}}{\text{Glutathion réduit}}$$
 était, pour ces glandes, très différent de la valeur trouvée pour les autres organes. Elles se classent donc tout à fait à part.

La richesse en glutathion de la glande surrénale attira l'attention d'un grand nombre d'auteurs, et Léon Binet put, à la suite de nombreuses expériences, établir le rôle des capsules surrénales dans le métabolisme du soufre.

Lœper, Lesure et Tonnet (279) avaient trouvé dans la surrénale jusqu'à 0,19 de soufre total pour 100 parties de glande sèche, le soufre oxydé représentant à peine 40 p. 100 du soufre total.

L'étude comparative du sang artériel et du sang veineux de la surrénale montra à Lœper, Decourt et Garcin (271) que la teneur du sérum en soufre total était moins élevée dans la veine que dans l'artère, cette diminution portant surtout sur le soufre neutre. La surrénale fixe donc $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{6}$ et même $\frac{1}{3}$ du soufre contenu dans le sang qui la traverse. Ces auteurs conclurent à une fonction thiopexique de la surrénale.

Ces résultats du plus haut intérêt font entrevoir le rôle joué par la surrénale dans le métabolisme du soufre. L'importance de ce rôle fut précisée par les travaux de Binet et de ses collaborateurs.

Après avoir mis en évidence la richesse de la glande surrénale en glutathion, ils recherchèrent la localisation de ce composé. Binet et Giroud (34) constatèrent que la réaction au nitroprussiate était beaucoup plus intense au niveau de la cortico-surrénale qu'au niveau de la médullaire. La zone corticale est donc beaucoup plus riche en glutathion. De plus, chez le Cobaye jeune, c'est la partie la plus interne de la substance corticale,

la zone réticulée, qui donne la réaction du glutathion la plus intense.

Binet, Blanchetière et Arnaudet (32) montrèrent que la surrénale était capable d'assurer la synthèse du glutathion.

Ils réalisèrent chez le Chien la perfusion des glandes surrénales avec du sang citraté additionné de cystine et d'acide glutamique. Le perfusat présenta alors une teneur en glutathion qui est au moins doublée par rapport au chiffre de départ. Dans la glande qui est perfusée, les chiffres relevés étaient de 750, 714, 729 et 781 milligrammes, alors que la glande témoin renfermait 555, 546, 488 et 455 milligrammes pour 100 grammes de glande. D'autre part, ils observèrent que le rein perfusé dans des conditions identiques ne présentait aucune modification du taux du glutathion.

Enfin, moyennant un grand nombre d'expériences, ces auteurs purent constater que divers facteurs biologiques retentissaient sur le taux du glutathion dans la capsule surrénale. La dépancréatation totale est suivie d'une légère diminution du taux du glutathion réduit dans cet organe.

Nous avons vu l'influence de la gravidité et de l'ovariotomie sur les teneurs en dérivés sulphydrylés des glandes surrénales.

Cette électivité du glutathion pour les glandes endocrines a fait rechercher la conséquence de l'ablation de ces organes sur les teneurs en glutathion de divers tissus.

Houssay et Mazzocco (185) enlevèrent les capsules surrénales à des Rats. Ils trouvèrent chez les Rats ainsi décapsulés une augmentation de glutathion réduit du muscle. Le foie présentait une teneur variable, en général un peu diminuée. Le rein avait un taux plus fixe, plus élevé chez les animaux décapsulés que chez les témoins.

Lœper et ses collaborateurs (275) avaient noté une augmentation notable de la thiémie après surrénalectomie. Après avoir dosé le soufre dans le sang de Chien, les auteurs pratiquaient la surrénalectomie gauche et

procédaient à de nouveaux dosages après 5, 12 et 22 jours. Ils constatèrent :

1° Que l'ablation de la surrénale augmentait la quantité de soufre sanguin;

2° Que l'augmentation du soufre après surrénalectomie s'accordait avec l'augmentation constatée du soufre chez les mélanodermiques.

A l'état normal, la peau fixe, utilise et sans doute élimine du soufre. Après surrénalectomie, même unilatérale, la richesse soufrée de la peau est encore plus considérable, l'augmentation étant environ 25 p. 100 du chiffre initial.

Nous avons vu que la dépancréatisation totale était suivie d'un abaissement de la teneur en dérivés sulfhydrysés des capsules surrénales. Blanchetière, Binet et Mélon (46) ont, en outre, constaté après cette ablation une diminution de la teneur du foie et à moindre degré de celle des muscles. Ils rapprochent ce fait de l'augmentation signalée par Houssay et Mazzocco (185) après surrénalectomie, ce qui s'expliquerait étant donné l'antagonisme bien connu du pancréas et des surrénales.

Après thyroïdectomie, da Cruz (78) ne trouve pas de résultats constants pour les taux de glutathion des testicules. D'ailleurs, Litarczek, Aubert et Nestoresco (259) ne trouvèrent pas de modifications du glutathion intrahématique chez des hyperthyroïdiens à métabolisme variant entre +25 et +56 pour cent. Seul le glutathion total était légèrement augmenté.

L'ablation de l'hypophyse, par contre, provoque des modifications importantes de la glutathionémie. Marrenzi (289), après avoir enlevé le lobe glandulaire de l'hypophyse au Crapaud, constata une baisse de 28 p. 100 de glutathion hépatique et de 32 p. 100 de glutathion musculaire. De plus, l'implantation de lobe glandulaire de Crapaud, ou l'injection d'un extrait de lobe antérieur bovin, produit une tendance au retour à la normale.

Maveroff de Lissner (296) confirme entièrement ces résultats et trouva que l'ablation de l'hypophyse diminuait le glutathion globulaire d'environ 10 p. 100 et,

inversement, les extraits alcalins de lobe antérieur d'hypophyse produisent, par injection, une augmentation du glutathion, même chez les Chiens hypophyso-prives ou thyroprives.

Il existe donc entre les glandes endocrines et le glutathion une relation certaine; cette relation sera du reste confirmée par l'étude des effets de l'injection d'hormones sur la glutathionémie.

II

Action de divers facteurs expérimentaux, sur le taux de glutathion

1. Substances dont l'administration peut entraîner des variations du taux de glutathion.

De nombreux auteurs ont recherché les conditions susceptibles de favoriser dans l'organisme la synthèse du glutathion. Nous avons vu précédemment que la surrénale était capable de faire cette synthèse lorsqu'on la perfusait avec du sang additionné d'acide glutamique et de cystine, mais le problème qui se pose ici est de savoir si l'administration de certaines substances peut avoir un retentissement sur la teneur en glutathion des tissus et du sang.

a) Substances soufrées.

Les substances soufrées paraissent les plus propres à augmenter le taux du glutathion dans l'organisme, et quelques auteurs ont recherché l'effet de l'administration de telles substances.

Cystine. — Nous savons que, si l'on soumet des Rats à un régime riche en cystine, la teneur en glutathion du tissu hépatique est augmentée.

Hyposulfite de soude. — Mais des substances de composition moins voisine de celle du glutathion sont capables d'une telle action, et Vojislav Arnovljevitch (11), ayant administré de l'hyposulfite de soude à des Pigeons par voie entérale, trouva une augmentation nette de la teneur en glutathion du sang et du foie. Dans le sang,

le taux normal étant compris entre 45 mg. et 62 mg., passe à celui de 70 mg. à 85 mg. pour 100 cm³ et, dans le foie où la teneur est habituellement comprise entre 280 mg. et 295 mg., on obtient, après traitement, des taux de 320 à 405 mg. pour 100 g. de tissu. Binet et Arnaudet (30) ont de même trouvé que, chez le Chien et le Lapin, l'administration d'hyposulfite provoquait une élévation du taux de glutathion du foie. Il en est de même pour de nombreux autres organes. Binet, Verne et Arnaudet (36) retrouvèrent ces résultats pour la glande surrénale dont le taux de glutathion croît également après administration d'hyposulfite. En outre, grâce à l'étude histochimique de l'épiderme du Lapin soumis au même traitement, ils constatèrent que la teneur en dérivés sulfhydrylés était supérieure à celle des Lapins normaux.

b) Substances diverses.

Un certain nombre d'autres substances, dont la constitution chimique n'a plus de rapport avec celle du glutathion, se sont montré capables de provoquer des variations de teneurs en glutathion des organes. C'est ainsi que Wolff et Mlle Manjean (414) ont constaté que des Chiens recevant tous les jours 2 grammes de sulfate de magnésium par voie buccale, avaient une teneur en glutathion du tissu hépatique plus élevée que celle des animaux témoins. La teneur des autres organes était, par contre, peu modifiée.

Gallet (133), étudiant l'action d'une solution hydroalcoolique d'éthers diphénoliques et de cétones cycliques, sur le taux du glutathion du sang et des tissus, trouva qu'une injection intra-veineuse du produit provoquait chez le Chien une augmentation du taux de glutathion dans le sang; de 14 mg. 6, il passait, 45 minutes après l'injection, à 23 mg. 1 pour 100 cm³. Dans un autre essai, un chien recevant pendant une semaine une injection intra-musculaire du produit avait, le neuvième jour, une glutathionémie de 72 mg. 5, alors que le taux initial était de 30 mg.

c) Hormones.

L'action des hormones sur la glutathionémie paraît des plus intéressantes, et Zunz (420)

en a fait une étude systématique. L'insuline aurait tendance à augmenter la teneur du sang artériel en glutathion réduit chez le Chien chloralosé. Cet accroissement n'atteindrait toutefois qu'exceptionnellement 10 à 12 mg. pour 100 cm³ de sang. Garrelon et Gallet (135) ne retrouvèrent pas d'action de l'insuline sur le taux de glutathion dans le sang. Par contre, la vagotonine augmenterait le taux de glutathion sanguin de plus du tiers. Aussi, peut-on se demander si la faible élévation de la teneur en glutathion constatée par Zunz (420) n'est pas due aux impuretés contenues dans l'insuline injectée. Cet auteur (421), reprenant ses essais, devait en effet constater que l'insuline purifiée n'exerçait pas d'effet réel sur la glutathionémie, mais que, sous l'influence de la vagotonine, la teneur des hématies en glutathion réduit tendait à s'élever.

L'adrénaline, chez le Chien, ne donne des résultats notables que par injections intra-veineuses et à des doses supérieures à 0 mg. 022 par kilog d'animal. L'augmentation de la glutathionémie atteint son maximum au bout de 1 h. 1/2 à 5 h. 1/2, puis fléchit graduellement. L'injection intra-musculaire a des effets moins accentués, et il faut une dose de 0 mg. 063 à 0 mg. 075 par kilogramme pour constater une augmentation modérée du taux du sang carotidien en glutathion réduit (422). La thyroxine déterminerait une augmentation du soufre des glandes surrénales d'après Parhon et Cahane (320), qui soumi-
rent des Rats et des Cobayes à des traitements thyroïdien et thyroxinique. Zunz (423) ne trouva, par injection de thyroxine, dans la saphène d'un Chien chloralosé, aucune modification du coefficient glutathionique obtenu en divisant la teneur de 100 cm³ de sang artériel en glutathion réduit (exprimé en mg.) par le nombre de globules rouges par mm³ de sang (exprimé en millions). La thyroglobuline produirait une augmentation modérée de ce même coefficient. L'extrait parathyroïdien par voie intramusculaire ou intraveineuse provoquerait une augmentation plus ou moins accusée du glutathion réduit.

L'action de l'hormone du cortex surrénal paraît intéressante à rechercher, étant donné le rôle éventuel de la surrénale dans le métabolisme du glutathion.

En 1931, alors que nous étudions avec M. Simonnet un mode de titrage biologique de la cortine, nous avons recherché les modifications de la constitution du sang, produites par injection de cette hormone. Nous étions arrivés, non seulement à trouver une action hyperglycémiant à certains extraits de cortex surrénal, mais nous avons mis en évidence des modifications, provoquées par ces extraits, des taux d'urée sanguine, du cholestérol, et, en particulier, du glutathion.

L'action de la cortine sur la glutathionémie est moins frappante que celle de cette hormone sur la glycémie ou même sur le taux de l'urée sanguine. Cependant, elle est nette, et nous avons, lors de nos essais, enregistré une augmentation du taux du glutathion sanguin. Toutefois, l'hyperglutathionémie obtenue diffère de l'hyperglycémie provoquée par les mêmes extraits, non seulement par l'amplitude des variations, mais surtout par le fait que l'augmentation de la teneur en dérivés sulphydrylés est beaucoup plus fugace. Vingt-quatre heures après l'injection, la glutathionémie est redevenue normale et, dans les premiers essais effectués, où nous pratiquions une injection quotidienne et des dosages des constituants sanguins 24 heures après la dernière injection, c'est-à-dire immédiatement avant l'injection suivante, nous n'observions aucune variation du taux des dérivés sulphydrylés. Mais, en effectuant des dosages à des périodes plus rapprochées, on constate une augmentation de la glutathionémie, qui atteint rapidement son maximum, généralement, deux ou trois heures après l'injection. L'augmentation maximum n'a jamais dépassé, dans nos essais, 30 pour 100 de la valeur initiale.

Winter, Reiss et Valdecasas (412) ont de même trouvé une élévation de la glutathionémie chez le Lapin et chez le Chien après injection de l'hormone du cortex surrénal. Zunz (424) a confirmé ces faits et a trouvé que, chez des Chiens chloralosés recevant lentement, dans la saphène, de l'extrait de capsules surrénales, le taux du sang en corps sulphydrylés augmentait peu à peu pour atteindre le chiffre le plus élevé quatre à cinq heures après l'injection, et redescendre ensuite.

La plupart des hormones agissent sur la glutathionémie. Cependant, cette action est en général peu accen-

tuée, et toute hypothèse reposant sur elle est bien fragile. Nous allons étudier l'action d'un deuxième groupe de substances qui mettrait en lumière un des rôles du glutathion : nous avons nommé les substances hyperthermisantes.

d) Substances hyperthermisantes.

L'hyperthermie, provoquant des modifications du métabolisme, on peut se demander si on ne trouve pas, parallèlement à une forte élévation de la température, une variation du taux de glutathion. Cliniquement, il ne semble pas qu'il y ait une relation très nette entre ces deux ordres de faits, et Achard et ses collaborateurs n'ont pas trouvé chez des malades atteints de pneumonie, dont la température était de 40°, de modification de la glutathionémie.

Expérimentalement, il en est tout autrement, et plusieurs auteurs ont trouvé des résultats intéressants lors de l'hyperthermie provoquée. Moraes et Casier (309) ont recherché si la teneur du foie, du muscle et du sang en glutathion réduit variait au cours de l'hyperthermie provoquée par le dinitro- α -naphtol sodique chez le Pigeon. Ils ont constaté dans ces conditions une diminution du glutathion réduit, tant hépatique que musculaire. Les Pigeons, soumis à un jeûne prolongé, chez lesquels le taux de glutathion a diminué fortement dans le sang, le muscle et le foie, ne réagissent plus ou très faiblement à l'action hyperthermisante du dinitro-naphtol et leur température ne s'élève plus que de 1°78 au lieu de 4°1. Mais la diminution notable du glutathion musculaire résultant d'un régime déficient en vitamines B n'empêche pas l'hyperthermie de se produire. Les auteurs pensent qu'il n'y a pas de rapport entre la teneur des tissus en glutathion réduit et l'intensité de la réaction hyperthermisante produite par le dinitro- α -naphtol chez le Pigeon. Binet et Weller (37) ont également recherché la teneur des organes en glutathion réduit au cours de l'hyperthermie provoquée. Ils injectèrent à six Chiens, par voie intraveineuse, 1 cm³ par kilogramme d'une solution aqueuse de dinitrophénol à 1 p. 100 neutralisée par la soude. Les animaux ont atteint une température centrale qui a varié de 42°5 à 44°3, et cer-

tains tissus subirent une baisse de la teneur en glutathion réduit. Légère pour les glandes surrénales, moyenne pour le tissu musculaire, cette baisse est accentuée pour le tissu pulmonaire et le tissu splénique. Elle contraste avec l'augmentation qui se produit parallèlement dans le tissu hépatique. Ces résultats ne concordent guère avec ceux de Moraes et Casier (309). On peut se demander si les variations des teneurs de glutathion sont en rapport avec l'hyperthermie provoquée ou avec le produit chimique injecté.

Waelsch et Weinberger (400) essayèrent diverses substances produisant expérimentalement une élévation de la température : Aolan, Hypertherman, Dmelcos et Pyri-fer; ils constatèrent que, chez l'Homme, quatre ou cinq heures après l'injection, on trouvait une augmentation des substances réductrices. Cette augmentation paraît dépendre de la température initiale et aussi de l'âge du patient. Il semble exister une valeur limite de la glutathionémie. Ces auteurs ont, d'autre part, injecté dans la veine de plusieurs Lapins de 100 à 200 mg. de glutathion réduit, et n'ont trouvé aucune modification de la température de l'animal, même lorsque le centre de la régulation thermique a été détruit par section de la moelle épinière au niveau de la sixième cervicale.

Le soufre, administré par injection intramusculaire ou intraveineuse, provoque une élévation de la température. Cette hyperthermie pouvant dépasser 40° et s'accompagnant de troubles du métabolisme. Michaux, Mollaret et Tonnet (305), ayant utilisé le soufre comme agent de pyrétothérapie chez des paralytiques généraux, tabétiques ou déments précoces, trouvèrent chez ces malades une augmentation de la teneur en glutathion réduit atteignant parfois 20 p. 100 du chiffre initial. De ces divers essais, on peut conclure que l'hyperthermie, en raison peut-être des modifications parallèles du métabolisme, provoque une augmentation de la glutathionémie et une variation du taux de glutathion des organes.

Est-il possible, par des moyens autres que l'administration de substances, de provoquer expérimentalement des variations de la glutathionémie?

2. Action de l'irradiation sur les taux du glutathion.

Quelques auteurs ont recherché l'influence des irradiations sur les teneurs en glutathion, soit de divers organes, soit du sang. Pincussen et Yokota (322) soumettre des Cobayes et des Rats blancs à l'irradiation au moyen d'une lampe à mercure. Les résultats obtenus ne sont pas très probants; cependant, ils notèrent une augmentation du taux du glutathion du foie et du poumon, mais une diminution de la teneur de la rate. Pour les muscles, alors que chez le Cobaye le taux est augmenté, il est diminué pour le Rat. Keeser (215) devait trouver que, sous l'influence des irradiations, la teneur en glutathion du sang et de la peau augmentait. Moncorps, Bohnstedt et Schmid (308) obtinrent, chez des Souris blanches, des élévations de la teneur en glutathion par irradiation. Le taux qui, avant l'expérience, était compris entre les chiffres extrêmes de 53 mg. et 112 mg., passait, après une heure, à des teneurs comprises entre 91 mg. et 179 mg., pour, après huit heures, atteindre des glutathionémies de 146 à 373 mg. pour 100 cm³ de sang.

3. Modifications de la teneur en glutathion des muscles.

Blanchetière, Binet et Mélon (45) recherchèrent si la contraction avait une action sur la teneur en glutathion des muscles. Ils trouvèrent que, parmi les réactions musculaires, la tétanisation faradique, poussée à fond, conduisait seule à une diminution nette et constante de la teneur en glutathion réduit. Dans le téтанos strychnique caractérisé par des attaques convulsives séparées par des périodes de repos, on ne constate aucune variation.

Léo Lira (248) trouva dans les muscles éternés une diminution de la teneur en glutathion qui a une valeur de 12 à 17 mg., alors que, dans le muscle normal, la teneur varie de 14 à 18 mg. p. 100 de tissu. Barrenscheen et Beneschovsky (15) vérifièrent tout d'abord la

teneur en glutathion réduit et en glutathion total dans les gastrocnémiens de la Grenouille. Le taux était identique dans les deux muscles symétriques. Après avoir sectionné le nerf sciatique d'un côté, ils ne trouvèrent pas de modifications du glutathion réduit dans le gastrocnémien correspondant.

4. Action de l'asphyxie sur le taux de glutathion.

Blanchetière et Binet (41) trouvèrent dans l'asphyxie mécanique des teneurs en glutathion réduit du poumon et du cœur nettement plus élevées que chez les animaux normaux. D'autre part, ces auteurs, en collaboration avec Mélon (47), trouvèrent que la traversée pulmonaire détermine une diminution de glutathion réduit dans le sang. L'hyperventilation n'a sur lui qu'une action très faible, tandis que l'asphyxie élève considérablement la teneur du glutathion, élévation qui persiste un certain temps après la reprise de la respiration normale. L'analyse du phénomène montre que cette augmentation n'est pas fonction d'une mobilisation des hématies, mais paraît en relation avec une réaction biochimique de celles-ci.

III

Le glutathion dans les états pathologiques

L'étude de la glutathionémie dans les états pathologiques est assez récente, et cependant il existe déjà un grand nombre de travaux relatifs à cette question. Les plus anciens et aussi les plus nombreux sont ceux concernant le cancer.

Cancer. — En 1924, Fleisch (120), pensant que, si une différence existait entre les tissus cancéreux et les tissus normaux, elle pourrait être de quelque intérêt dans l'étude du cancer, rechercha si les processus d'oxydation étaient comparables dans les deux cas. En particulier, il rechercha si les résidus thermostables de sarcome réagissaient sur le glutathion d'une façon identique à celle qu'avait notée Hopkins (178) pour les résidus thermostables de muscles. Il ne trouva aucune différence. D'autres investigations suivirent, dirigées vers d'autres aspects de la question. De nombreux travaux ont été entrepris afin d'établir le taux de glutathion des tissus néoplasiques.

Les résultats donnés par les divers auteurs sont assez divergents. Alors que Holmes (175), Jura (213), Fornieles et Ulibarri (130) trouvent que les tissus cancéreux contiennent des quantités anormalement faibles de glutathion réduit, la plupart des autres auteurs donnent des conclusions opposées. Pour Vøegtlin et Thompson (398), les tumeurs contiendraient du glutathion en quantités

comparables à celles du foie et, pour des tumeurs peu volumineuses, on trouve environ 130 à 180 mg. de glutathion pour 100 g. de tissu.

Lorsque les proportions de la tumeur augmentent, le taux du glutathion des autres organes diminue et, pour une tumeur d'un poids égal à 39 p. 100 du poids du corps, le foie a un taux de 89 mg. p. 100 g., les muscles de 10 mg., les reins et le cerveau ne contiennent plus de dérivés sulfhydrylés; quant à la tumeur, sa teneur est de 61 mg. pour 100 g.

Lecloux, Vivario et Firket (242) trouvent également plus de glutathion dans les tissus sarcomateux que dans les tissus de même origine. Firket (117) remarque que cette augmentation est surtout nette au début du processus néoplasique. Cette constatation peut être rapprochée de celle qu'avaient faite Bierich, Rosenbaum et Kalle (26) que la teneur en glutathion, dans les tumeurs, était en étroite relation avec le nombre d'éléments cellulaires présents, et diminuait à mesure que la proportion de tissu conjonctif augmentait.

Il est donc très difficile de conclure, et on peut penser que les divergences qui séparent les auteurs sont peut-être dues, d'une part à ce que les processus de néoformation sont très variables; d'autre part, la partie nécrosée des tumeurs ne contient pas de dérivés sulfhydrylés, et il se peut que les différences proviennent de ce que les auteurs ont conservé ou éliminé ces parties.

On peut noter un fait intéressant, mentionné par Vœgtlin et Thompson (398) et aussi par Bierich et Kalle (23), et concernant la teneur des tissus cancéreux en glutathion oxydé. Vœgtlin et Thompson (398) pensent que, dans ces tissus, il existe un trouble dans l'équilibre entre la forme réduite ($-SH$) et la forme oxydée ($-S-S-$). Les tumeurs comparées aux tissus normaux contiennent, sous la forme oxydée, une plus grande proportion du glutathion total.

Si les auteurs ne sont pas d'accord sur les teneurs en glutathion des tumeurs, la glutathionémie est, de l'avis général, abaissée chez les sujets porteurs de cancer.

Toutefois, Chatain (74), après avoir dosé le glutathion dans le sang de 30 malades, n'observe aucune différence.

Mais Hirsch (170), Woodward et Fry (415), Achard Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5), Wilhelm et Stern (409) et un certain nombre d'autres auteurs ont trouvé une diminution du taux du glutathion sanguin.

Hirsch (170), qui, parallèlement à cette modification de la glutathionémie, avait trouvé une augmentation du taux de dérivés sulphydrylés des tissus néoplasiques, émet l'hypothèse que ce décalage entre les tissus et les tumeurs représenterait le potentiel d'oxydo-réduction de l'organisme. Ce potentiel est donc élevé dans les tissus néoplasiques tout comme il l'est dans les organismes jeunes, alors qu'il s'égale et se stabilise à l'âge adulte. Lecloux, Vivario et Firket (242) avaient pensé aussi à rapprocher les tumeurs des tissus embryonnaires, en raison des taux élevés de dérivés sulphydrylés trouvés dans les deux cas. La forte teneur en glutathion ne serait pas un caractère de malignité, mais montrerait simplement l'exagération d'un métabolisme cellulaire.

Pour Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5), la diminution de la glutathionémie observée dans quelques cas de cancer serait en rapport avec l'anémie du sujet, et, dans un état cachectique suivi de mort, ces auteurs ne trouvèrent plus que 18 mg. 42 pour 100 cm³ de sang.

Anémie. — Dans l'anémie, en effet, on observe une diminution appréciable du taux du glutathion sanguin. Cet abaissement, toutefois, est en rapport avec la diminution du nombre des hématies, et la concentration globulaire du glutathion est généralement très augmentée. De nombreux auteurs firent cette constatation : Gabbe (131), Varela, Duomarco et Munilla (382), puis Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5). Dans l'anémie expérimentale, Litarczek et ses collaborateurs (253), puis Bach et Korpassy (13), retrouvèrent les mêmes faits. Chez le Lapin, Varela, Duomarco et Munilla (382) ont obtenu une telle augmentation globulaire du glutathion, que la glutathionémie, loin de diminuer, s'accroît d'une manière considérable. Hirano (169) ne trouve pas de modification dans le sang de Lapin ayant subi de petites saignées. Après une grosse perte de sang, la teneur baissa d'abord, et une heure après la saignée le taux est nette-

ment abaissé; il remonte toutefois assez rapidement, mais ne redeviendrait normal qu'après 4 à 7 jours.

Litarczek et ses collaborateurs (267) ont trouvé une augmentation de pourcentage en glutathion oxydé, dans des cas cliniques d'anémie, le pourcentage en glutathion réduit (50-63 p. 100) était moindre que chez les individus normaux (71,2 p. 100). Ce fait serait dû à la diminution de l'hémoglobine. Ils admettent, en effet, le pouvoir inhibiteur de ce pigment sanguin sur l'oxydation du glutathion, c'est-à-dire la réduction de ce dernier par l'hémoglobine.

Toute une série d'expériences, très intéressantes, ont été faites par ces auteurs afin d'établir le rapport existant entre le glutathion et l'hémoglobine. D'une part, ils ont noté une relation directe entre l'accroissement du glutathion réduit intraglobulaire et l'abaissement de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Ils montrèrent que l'addition de glutathion cristallisé à du sang hémolysé produisait un abaissement notable de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine, le glutathion empêchant probablement, par son pouvoir réducteur plus fort que celui de l'hémoglobine, la saturation plus complète de celle-ci en oxygène. En outre, l'addition *in vitro* de glutathion au sang de Lapin produit généralement un déplacement divergent de la bande de l'oxy et de la carboxyhémoglobine. Ce fait a été retrouvé au cours de l'anémie expérimentale. Avec la progression de l'anémie, correspondant à une augmentation du glutathion, les bandes α de l'oxy et de la carboxyhémoglobine se déplacent d'une manière divergente, ce qui fait que la différence entre la position de ces deux bandes ou «span» exprimée en unités Angström augmente.

Litarczek et ses collaborateurs ont été conduits à admettre l'existence d'une combinaison chimique entre le glutathion et l'hémoglobine. Le glutathion serait englobé d'une façon plus ou moins stable ou labile dans l'énorme molécule de la globine. Quoi qu'il en soit, on constate un comportement parallèle de l'hémoglobine et du glutathion chez les sujets atteints d'anémie. Leur taux dans le sang est généralement diminué alors que

chaque globule en contient une plus forte proportion que chez le sujet normal.

Tuberculose. — L'étude des modifications des teneurs en glutathion dans la tuberculose paraît être intéressante et il semble que le rôle des oxydo-réductions, dans cet état pathologique, soit des plus importants.

Delore (87) a recherché la teneur en glutathion réduit des tissus animaux au cours de la tuberculose. Une première série d'expériences fut faite sur le Cobaye sacrifié après l'inoculation tuberculeuse. L'auteur n'obtint pas de résultats constants et il refit un second groupe d'essais sur des Bovidés se tuberculisant spontanément comme l'Homme. Mais, pas plus chez le Bœuf que chez le Cobaye, l'infection tuberculeuse ne semble modifier la teneur en glutathion réduit des organes analysés, que ces organes soient apparemment sains ou au contraire qu'ils soient le siège de lésions tuberculeuses.

La glutathionémie semble modifiée chez les tuberculeux, et si Olivier (318) trouva, par des dosages dans le sang de treize tuberculeux pulmonaires, que le taux de glutathion réduit est normal ou augmenté, la plupart des auteurs notent généralement une diminution de la glutathionémie dans la tuberculose. Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5) notèrent chez quelques bacillaires une diminution du glutathion qu'ils attribuèrent à l'anémie consécutive. Béthoux et Carraz (22) trouvèrent également un abaissement du taux du glutathion sanguin, cette diminution portant tant sur le glutathion réduit que sur le glutathion oxydé. Mais, tandis que, pour le premier, l'abaissement du taux est faible et fixe, et peut être attribué au léger degré d'anémie, pour le glutathion oxydé la diminution est plus variable et paraît être due à d'autres facteurs. Cette variation ne semble pas, pour les auteurs, être en rapport avec la gravité de la maladie, ni avec l'étendue du processus de caséification.

Ce n'est pas tout à fait l'opinion de Dufourt et Perrot (98) qui, chez neuf malades à formes de tuberculose pulmonaire fibreuse ou fibro-caséeuse stabilisée et à pronostic favorable, trouvèrent les taux de: 42 mg. 5; 40 mg.; 40 mg.; 40 mg.; 38 mg. 4; 34 mg.; 33 mg. 5; 33 mg.; 33 mg., et chez sept malades graves, à forme évolutive, obtin-

rent les teneurs de : 32 mg.; 31 mg. 5; 31 mg. 4; 31 mg.; 30 mg.; 30 mg.; 30 mg. de glutathion réduit pour 100 cm³ de sang. Ces chiffres leur permirent de conclure que, dans les formes favorables, on trouve des résultats normaux alors que, dans les formes évolutives, les chiffres sont assez notablement abaissés.

Diabète. — Chez les diabétiques, V. Arnovljevitch (12) trouva, à côté de l'hyperglycémie, de l'hypoglutathionémie, le rapport glycémie/glutathionémie étant fortement augmenté. Chez l'Homme normal, ce rapport est en moyenne de 2,5 et varie de 2,2 à 2,8; chez les diabétiques, il atteint facilement 8 ou 9, et serait d'autant plus élevé que l'état du diabétique est plus défavorable. Il diminue pendant le traitement, lorsque l'état du malade devient favorable. Mirko Arnovljevitch (10) retrouva ce rapport expérimentalement; après administration d'insuline, la glutathionémie s'élève en même temps que la glycémie s'abaisse.

L'existence d'un tel rapport nous paraissant du plus grand intérêt, nous avons cherché si l'injection de glutathion à un Chien ne provoquerait pas simultanément une augmentation de la glutathionémie et une diminution de la glycémie. Après avoir prélevé du sang à un Chien de 12 kilogs, nous lui avons injecté 2 mg. 5 de glutathion par kilog. De nouvelles saignées ont été faites 15 minutes, 30 minutes, 1 heure et 3 heures après l'injection. Dans le sang recueilli, nous avons fait un dosage de glucose et un dosage de glutathion. Voici les résultats obtenus.

TEMPS PAR RAPPORT AU MOMENT DE L'INJECTION	GLUTATHIONÉMIE (en mg. pour 100 cm ³)		GLYCÉMIE EN GRAMMES PAR LITRE
	G	G'	
Avant	35,2	42,6	0,975
15 minutes après	35,9	43,5	1,180
30 minutes après	34,8	41,2	1,085
1 heure après	33,1	39,2	0,980
3 heures après	33	38,5	1,030

Nous n'avons pas retrouvé là des résultats comparables à ceux de M. Arnovljevitch. D'ailleurs, Campanacci (65), Labbé et Nepveux (235), Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5), à l'inverse de V. Arnovljevitch (12), n'ont pas observé de proportionnalité entre la teneur en glutathion du sang et la glycémie. Ils ont toutefois, ainsi que Kitamura (229), Varela et ses collaborateurs (377), observé une diminution de la glutathionémie qui, pour Achard et ses collaborateurs (5), semble s'accroître dans les cas où l'on observe de l'acétonurie.

Cirrhoses et ictères. — Lœper (270) et ses collaborateurs étudièrent, dès 1925, la thiémie dans les états hépatiques; mais ce n'est que quelques années plus tard que cette étude fut étendue aux modifications de la glutathionémie. Binet et Arnaudet (30) observèrent que la ligature aseptique du canal cholédoque amenait chez le Chien un abaissement du taux du glutathion réduit dans le tissu hépatique. Varela, Munilla et Duomarco (386) ne trouvèrent pas chez le Chien et le Cobaye de modifications appréciables du glutathion hépatique par ligature du canal cholédoque. Ils retrouvèrent toutefois chez le Lapin une diminution marquée, mais chez les Rats, les Chats et les Pigeons, ils obtinrent, après la même opération, une augmentation considérable du taux du glutathion dans le foie. Il est donc assez difficile de tirer de ces résultats divergents une conclusion quelconque. Labbé et Nepveux (235), chez douze cirrhotiques, notèrent un abaissement de la glutathionémie, le taux moyen étant de 11 mg. 4 pour 100 cm³ de sang.

De même, Binet et Arnaudet (31) trouvèrent dans les affections hépatiques une diminution de la glutathionémie. Cet abaissement est peu marqué dans l'ictère catarrhal, mais est notable au cours des ictères dus à un calcul du cholédoque. Dans la cirrhose de Laënnec (non ictérogène), la diminution de la glutathionémie serait en rapport direct avec l'atteinte du parenchyme hépatique. La même constatation se rapporte à la cirrhose pigmentaire, où l'abaissement semble tenir de la double insuffisance pancréatique et hépatique. Varela, Munilla et Duomarco (386) trouvèrent des résultats comparables dans les ictères. La diminution du glutathion

serait un phénomène d'apparition tardive et se prolongerait longtemps après la disparition de l'ictère. De plus, la réduction du glutathion dans le sang correspondrait directement au glutathion globulaire, car on ne trouve aucune réduction parallèle des globules rouges du sang. Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5), ayant déterminé la teneur du sang en glutathion chez un certain nombre de malades atteints d'ictères infectieux, de cirrhoses éthyliques ou de polynévrites éthyliques, obtinrent des taux très voisins de la normale pour le glutathion réduit, mais les teneurs en glutathion total étaient légèrement abaissées.

Etats rhumatismaux. — Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5) n'ont pas trouvé de variations importantes de la glutathionémie chez quelques malades atteints de rhumatismes d'origines diverses : rhumatisme chronique, arthrite sèche du genou, purpura rhumatoïde, arthrite gonococcique. Labbé et Nepveux (235), chez 29 sujets goutteux, ont trouvé une glutathionémie abaissée. Lœper, Lesure et Tonnet (281), recherchant le métabolisme soufré dans les processus articulaires chroniques, ont trouvé six fois sur huit une glutathionémie nettement inférieure à la normale. Le rapport $\frac{\text{glutathion}}{\text{soufre total}}$ est, dans tous les cas, bien inférieur au chiffre normal de 8 et oscillerait entre 2,4 et 4,5.

Maladie d'Addison. — L'étude de la glutathionémie dans la maladie d'Addison semble devoir être du plus haut intérêt, étant donnée l'intervention des capsules surrénales dans le métabolisme du soufre, si magistralement mise en lumière par Binet et ses collaborateurs.

Cependant, cette étude ne semble pas avoir attiré un grand nombre de chercheurs, ou du moins les résultats obtenus n'étaient pas ceux qu'on pouvait attendre. L'étude du sérum sanguin de sujets atteints de maladie d'Addison a montré à Lœper et ses collaborateurs (282) une augmentation du taux du soufre total : 0 g. 20 à 0 g. 30 au lieu de 0 g. 07 ou 0 g. 08 au litre chez l'individu normal, cette élévation portant surtout sur le soufre

neutre. Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann donnèrent pour quatre addisonniens les chiffres suivants : 34 mg. 65; 36 mg. 43; 35 mg. 92; 42 mg. 78. Le taux est donc peu modifié. Nous-même avons recherché la glutathionémie chez des sujets atteints de la maladie d'Addison sans trouver de variations appréciables.

Dermatoses. — La peau renfermant des dérivés sulfhydrylés, une affection de ce tissu peut retentir sur le métabolisme du glutathion et entraîner des modifications de la glutathionémie. Morel, Gaté et Dorche (311) trouvèrent un abaissement de la teneur du sang en composés sulfhydrylés dans l'eczéma et dans le psoriasis. C'est ainsi que, chez un eczémateux en pleine poussée, ils trouvèrent $G = 10$ mg. et $G' = 15$ mg. p. 100 cm³ de sang. De plus, ils constatèrent un relèvement du taux du glutathion vers la normale, parallèlement à l'amélioration clinique de la dermatose, l'abaissement de la glutathionémie étant temporaire et contemporain de la poussée cutanée. Malowan (286), qui étudia le comportement du glutathion chez des Cobayes ayant des dermatoses, ne rechercha pas la glutathionémie, mais seulement le taux des dérivés sulfhydrylés dans le foie; il trouva généralement de fortes teneurs.

Etats divers. — Chez les obèses, Labbé et Nepveux (235) trouvèrent des teneurs du sang en glutathion inférieures au taux normal. Ils retrouvèrent ce fait dans tous les troubles de la nutrition.

Dans la pneumonie, pendant la crise, Achard, Mlle Jeanne Lévy et Guthmann (5) ne trouvèrent pas de modification de la glutathionémie. Ils n'en trouvèrent pas non plus dans la maladie de Basedow, ou du moins le nombre d'essais est insuffisant pour permettre une conclusion. Toutefois, les chiffres obtenus : 53 mg. 14 et 53 mg. 1, sont plutôt élevés.

Villela et Campos (388) trouvent une augmentation de la glutathionémie dans l'hyperglobulie, ce qui est normal étant donné que, dans le cas étudié, le nombre des globules rouges était passé à 10 millions.

Malkin (285) trouve chez les individus normaux de 45 à 55 mg. p. 100 de glutathion, tandis que chez les

cardiaques le taux est plus bas, que ce soient des cardiaques avec ou sans décompensation, avec ou sans œdème.

Anesthésie. — (Quoique l'anesthésie ne soit pas un état pathologique, nous dirons un mot de son influence qui légitimera sa place.)

Ruggieri (350) trouva un abaissement du taux du glutathion dans le sang de 21 sujets opérés sous anesthésie à l'éther, la glutathionémie ne redevenant normale qu'après 48 heures. Chez trois sujets opérés sous anesthésie spinale et deux sous anesthésie locale, la diminution du glutathion sanguin était moins accentuée. Pour l'auteur, cet abaissement de la glutathionémie est regardé comme une cause probable d'acidose et d'hyperglycémie post-anesthésique.

CHAPITRE VII

LE ROLE ANTITOXIQUE DU GLUTATHION

Ce rôle fut entrevu par un certain nombre d'auteurs et, dès 1925, Vœgtlin, Dyer et Léonard (391) montrèrent le pouvoir antitoxique que possède le glutathion vis-à-vis de l'arsenic.

Des Rats à jeun depuis dix-huit heures recevaient une injection d'arsenoxyde (oxyde 3-amino-4-hydroxy-phénylarsénieux), à raison de 10 cm³ M/100 par kilogramme d'animal.

Les Rats mouraient rapidement avec les symptômes habituels. En administrant du glutathion par voie intraveineuse, immédiatement avant l'injection de la même dose d'arsenoxyde, les Rats survivaient au moins deux semaines. Si l'injection de glutathion a lieu après celle d'arsenoxyde, l'effet antitoxique est encore net pour un intervalle de vingt minutes entre les deux injections. Vœgtlin et ses collaborateurs (397) devaient continuer cette étude et trouver que les oxydes arsénieux, en concentration relativement faible, produisaient une diminution de l'oxydo-réduction, ce qui pourrait expliquer le rôle du glutathion dans l'intoxication.

Blanchetière et Binet (41), en 1926, cherchèrent si, dans quelques intoxications, on ne trouvait pas de modifications de la teneur des tissus en glutathion, mais ils ne trouvèrent aucune variation notable du taux des dérivés sulfhydrylés dans les divers organes, après intoxication oxycarbonée ou cyanhydrique. Delore (87) retrouva la même constance de la teneur en glutathion au cours de diverses intoxications expérimentales : huile phosphorée, acide arsénieux, novarsénobenzol.

Handovsky, Casier et Schepens (149) purent, chez les Pigeons et le Chien, inhiber l'effet de doses certainement mortelles de dinitropentylphénol en administrant

préventivement ou curativement par la voie intraveineuse des doses assez élevées de glutathion. C'est ainsi que 0 g. 40 de ce composé inhibent l'action de 5 mg. de pentyl. Ces doses étant administrées par kilog d'animal.

Sannié (354), recherchant, au cours d'un important travail, les antidotes de l'intoxication par divers nitriles et en particulier par l' α -amino-propionitrile, fut amené à essayer l'action du glutathion. Il trouva à ce corps une action préventive lorsqu'il est administré à raison de quatre fois la quantité isomoléculaire du nitrile. Aucune action curative ne fut reconnue au glutathion.

CHAPITRE VIII

**ACTION DU GLUTATHION DANS
L'INTOXICATION CYANHYDRIQUE**

Généralités sur l'intoxication cyanhydrique

Dans l'étude de l'utilisation du glutathion en toxicologie, notre attention a été attirée particulièrement sur l'action possible de ce corps dans l'intoxication cyanhydrique.

Il est admis qu'absorbé à dose suffisante, l'acide cyanhydrique provoque presque instantanément la mort, par une sorte de sidération du bulbe. Il paralyse les centres vaso-moteurs et la thermogénèse. Rabuteau le classait comme un poison hématique, car il est constant que l'acide cyanhydrique modifie profondément les fonctions respiratoires du sang.

Bödine (54) attribue les effets toxiques foudroyants de l'acide cyanhydrique et des cyanures à trois causes :

- a) Facilité de pénétration dans les cellules;
- b) Acidité très faible (hydrolyse des sels en milieu neutre ou peu alcalin);
- c) Leur activité propre.

On a constaté que les cellules de levure cessent de consommer de l'oxygène quand on y ajoute du cyanure de potassium. Il en est de même pour diverses cellules

animales. L'acide cyanhydrique inhibe la croissance des Bactéries. Il est vrai que, pour Lœffler et Rigler (269), cet effet toxique sur les cellules bactériennes serait dû surtout à une interférence non spécifique sur le métabolisme de la cystine, plutôt qu'à un changement dans les potentiels d'oxydo-réduction.

Si on injecte du cyanure de potassium à un animal, le sang ne se modifie plus; la quantité d'oxyhémoglobine augmente, car les cellules ne consomment plus d'oxygène. Cette modification des fonctions respiratoires du sang peut d'ailleurs être constatée *in vitro*. Le sang normal décompose tumultueusement l'eau oxygénée, en oxygène et en eau; l'addition d'une seule goutte d'acide cyanhydrique empêche cette décomposition. L'acide cyanhydrique arrête donc les échanges et produit une sorte d'asphyxie interne.

Il convient de noter cependant que, pour certains auteurs, cet arrêt des échanges serait une conséquence de la cessation des fonctions du bulbe.

Quoi qu'il en soit, on peut considérer que l'acide cyanhydrique est un poison du protoplasma, un paralysant de l'hématose.

Du point de vue toxicologique, l'organisme normal possède une capacité rapidement accrue de désintoxication. Si l'injection est rapide, les cyanures tuent; mais si l'injection est lente, l'organisme est capable de se désintoxiquer par formation, prétendent certains auteurs, de sulfocyanure. Aussi, parmi les antidotes utilisés, les premiers ont-ils été les composés soufrés. Dès 1895, Lang (238) pensa qu'en donnant du soufre, sous forme labile, à l'organisme intoxiqué, on augmenterait la possibilité de formation de sulfocyanure dans ce même organisme. Pour vérifier cette hypothèse, il administra au Cobaye, par différentes voies, cyanure et hyposulfite, ce dernier une minute après au plus tard. Les résultats ont varié selon les voies d'introduction du toxique et les voies d'introduction de l'antidote. Mais, en général, Lang put conclure que les injections d'hyposulfite de soude pouvaient s'opposer à l'intoxication cyanhydrique.

Plus tard, Heymans (168) montra que si, par voie intraveineuse, on administrait l'hyposulfite avant le cyanure de potassium, il n'y avait pas d'intoxication cyanhydrique.

Hug (186), à son tour, étudia l'action de l'hyposulfite de soude; mais, d'après ses expériences, conclut que cet antidote nécessitait, pour exercer son plein effet, un temps de latence d'environ une demi-heure pendant lequel il est transformé. Il rechercha donc d'autres produits pour lutter contre l'intoxication cyanhydrique. Parmi ceux-ci, citons le bleu de méthylène, le nitrite de soude, le sulfure de sodium.

Le bleu de méthylène semble augmenter la consommation d'oxygène et par là lutter contre l'intoxication. Le nitrite de soude transformerait l'hémoglobine en méthémoglobine, celle-ci formant avec le cyanure de potassium un composé fixe non toxique.

Hug (186) parle également des sucres, ayant une fonction cétone ou une fonction aldéhyde libre, qui sont capables de fixer le cyanure de potassium.

D'autres auteurs ont également étudié l'action de certains corps comme antidotes de l'intoxication cyanhydrique.

Violle (389) étudia l'action du glucose. Il donna du glucose à des Lapins, puis il les enferma dans une atmosphère contenant de l'acide cyanhydrique. Tous les animaux réagirent fortement, mais ils survécurent, quoique la dose absorbée fût plusieurs fois la dose mortelle.

Brooks (59), à son tour, constata que, si on insensibilise des Rats, par inhalation de CNH gazeux, leur vitesse de retour à la normale peut être accentuée très notablement par des injections intrapéritonéales de bleu de méthylène. Pour Cohen (76), les propriétés oxydo-réductrices du bleu de méthylène compenseraient la perte d'oxygénation des tissus, pendant la diminution de l'hémoglobine due à l'empoisonnement cyané.

Chen, Rose et Clowes (75) étudièrent un certain nombre de nitrites et en particulier le nitrite d'amyle, qui, en inhalations, serait un bien meilleur antidote que le bleu de méthylène.

Enfin, Achard et Binet (4) étudièrent en détail l'action préventive et curative de l'hyposulfite de soude dans l'intoxication cyanhydrique. Ils utilisèrent de petites Carpes d'étang, comme animaux d'expérience, et purent conclure que l'addition d'hyposulfite de soude au cyanure retarde ou même empêche la mort de l'animal, et que l'hyposulfite est un antidote préventif et curatif de l'intoxication par le cyanure de potassium chez le Poisson.

L'utilisation comme antidotes de l'intoxication cyanée, de certains composés sulfurés et le fait, constaté par les auteurs, que tous les antidotes efficaces étaient doués de propriétés réductrices, nous ont amenée à penser que le glutathion pourrait, lui aussi, être heureusement employé. C'est un composé à groupement sulfhydrylé et nous avons exposé plus haut ses propriétés oxydo-réductrices.

II

Recherche de la dose toxique d'acide cyanhydrique

Tous les auteurs admettent que l'action physiologique de l'acide cyanhydrique est différente selon qu'on l'absorbe en nature (notamment en vapeurs) ou qu'il est libéré dans l'organisme par une substance cyanogénétique. En général, on admet que la dose toxique est pour l'Homme d'environ 0 g. 05. Le Cobaye serait plus résistant, et la dose toxique de CNH serait de 0 g. 005 par kilog, alors que l'on peut estimer que pour l'Homme elle est de 0 g. 001 par kilog. Voici d'ailleurs un tableau résumé des travaux de différents auteurs, quant à la toxicité de l'acide cyanhydrique vis-à-vis de divers animaux.

TOXICITÉ DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE
VIS-A-VIS DE CERTAINS ANIMAUX

ANIMAL	MODE D'ADMINISTRATION	DOSE TOXIQUE EN GRAMMES PAR KG. EXPRIMÉE EN CNH	AUTEURS
Lapin	sous-cutanée	0,003	Lang
Lapin	sous-cutanée	0,002 à 0,003	Heymans et Masoin
Lapin	intra-veineuse	0,0019	Desgrez
Pigeon	intra-musculaire	0,0015	Meurice
Souris	sous-cutanée	0,005	Hunt
Cobaye	sous-cutanée	0,0032	Desgrez

Ayant choisi le Cobaye comme animal d'expérience, nous avons tenu à contrôler quelle était exactement pour lui la dose mortelle d'acide cyanhydrique.

Nos essais ont été faits sur des Cobayes adultes, mâles ou femelles, dont les poids variaient de 400 à 600 grammes.

Nous avons injecté, à une première série de Cobayes, une solution décinormale de cyanure de potassium, neutralisée extemporanément dans la seringue, à une dose correspondant à 4 mg. 42 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal. Les Cobayes sont morts trois minutes environ après l'injection. Au bout de 30 secondes, les animaux sont pris de convulsions, ils font des bonds de 20 à 25 centimètres, puis retombent et meurent par asphyxie.

Nous avons alors injecté, dans les mêmes conditions, à un second lot d'animaux des doses de cyanure correspondant à 3 mg. 50 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal. Une ou deux minutes environ après l'injection apparaissent les symptômes de l'intoxication, laquelle débute par de petites convulsions; puis l'animal s'étend un peu, reste immobile, sa respiration devient difficile et il meurt par asphyxie.

Nous avons ensuite essayé l'injection de 3 mg. d'acide cyanhydrique par kilog d'animal; les symptômes d'intoxication se manifestent deux minutes après l'injection et les animaux meurent en moyenne au bout de trois minutes.

Avec une dose de 2 mg. 5 par kilog, l'intoxication débute encore par de la titubation, des convulsions violentes, puis l'animal fait un bond de 25 centimètres environ, retombe, se couche sur le flanc, le cœur s'arrête et l'animal meurt par asphyxie 7 à 8 minutes après l'injection.

Si l'on injecte une dose de 2 mg. d'acide cyanhydrique, les animaux meurent encore en 7 ou 8 minutes, parfois 10. A la dose de 1 mg. 50 la mort ne survient que 15 et même 20 minutes après l'injection.

Enfin, nous avons injecté 1 mg. d'acide cyanhydrique par kilog, et les Cobayes ne sont pas morts. Augmentant

faiblement la dose, nous avons fait des injections de solution N/50 de cyanure de potassium, correspondant à 1 mg. 25 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal. Les Cobayes sont morts.

Nous avons donc estimé que, dans les conditions de notre expérimentation, la dose de 1 mg. 25 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal est, pour le Cobaye, la dose mortelle.

Ayant ainsi déterminé la dose d'acide cyanhydrique mortelle pour le Cobaye, nous avons recherché quelle influence pouvait avoir le glutathion sur cette intoxication provoquée.

III

Essais de survie par injections de glutathion

Nos expériences ont donc consisté à injecter aux Cobayes des doses normalement mortelles d'acide cyanhydrique, et à voir si nous pouvions éviter l'intoxication par une injection de glutathion.

Voici rapportées quelques-unes des expériences que nous avons effectuées.

Expérience 1. — Cobaye femelle de 320 grammes :

A 17 h. 28, nous avons administré à l'animal, par voie sous-cutanée, 0 mg. 4 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 74 de solution de cyanure de potassium N/50, neutralisée) soit 1 mg. 25 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal, dose que nous avons reconnue mortelle pour le Cobaye.

A 17 h. 31, début des symptômes d'intoxication, l'animal titube et finalement tombe sur le côté.

A 17 h. 33, nous lui injectons 1 cm³ de solution représentant 2 mg. 27 de glutathion, ce qui correspond à Q. M./2 par rapport au cyanure (1).

Dès 17 h. 34, le Cobaye est pris de violents tremblements des membres antérieurs et des membres postérieurs ; il reste étendu et tremble sans arrêt, jusqu'à 17 h. 50 ; à ce moment, il tente de se relever, mais retombe sur le côté.

Enfin, à 17 h. 53, l'animal se relève, trotte normalement et, apparemment, semble redevenu normal.

Il a survécu.

1. Q.M. représente la quantité isomoléculaire.

Expérience 2. — Cobaye mâle de 390 grammes :

A 17 h., nous injectons au Cobaye 0 mg. 49 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 90 de solution de cyanure de potassium N/50, neutralisée), soit 1 mg. 25 par kilog.

A 17 h. 03, l'animal est pris de petites convulsions, à 17 h. 05 il tombe sur le flanc. Nous injectons alors une quantité de solution correspondant à 2 mg. 77 de glutathion. Après une minute environ apparaissent des tremblements, mais bientôt les troubles de l'intoxication s'atténuent, le Cobaye reprend une attitude normale, il survit.

Expérience 3. — Cobaye femelle de 347 grammes :

A 11 h. 14, injection de 0 mg. 52 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 96 de solution de cyanure de potassium N/50, neutralisée), soit 1 mg. 50 par kilo.

Les symptômes habituels apparaissent et le Cobaye tombe sur le flanc. A 11 h. 19, nous injectons une solution de 2 mg. 96 de glutathion.

Le Cobaye a de la dyspnée et les réflexes oculaires sont nuls, cependant il respire encore. A 11 h. 27, il respire encore avec difficulté, mais les réflexes sont devenus positifs, l'animal est toujours couché sur le flanc et ne fait aucun mouvement. A 11 h. 30, il est pris de légers tremblements, et à 11 h. 45, il se redresse et reprend rapidement son attitude normale. Il survit.

Expérience 4. — Cobaye femelle de 600 grammes :

A 17 h. 23, injection de 1 mg. 20 d'acide cyanhydrique (2 cm³ 2 de solution de cyanure de potassium N/50), soit 2 mg. d'acide cyanhydrique par kilog. A 17 h. 30, début des symptômes d'intoxication, et à 17 h. 40 le Cobaye tombe sur le côté, sans réflexes. Nous injectons alors une solution de glutathion correspondant à 6 mg. 82 de ce composé, et nous observons le cycle précédemment décrit. A 18 h. 25, le Cobaye se redresse et semble normal. Il a survécu.

Expérience 5. — Cobaye mâle de 432 grammes :

A 14 h. 30, injection de 0 mg. 86 d'acide cyanhydrique (1 cm³ 57 de solution N/50 de cyanure de potassium), soit 2 mg. par kilog d'animal.

Après 4 à 5 minutes, les caractéristiques de l'intoxication cyanhydrique apparaissent, et lorsque le Cobaye tombe sur le flanc, sans aucun réflexe, nous injectons une solution renfermant 4 mg. 91 de glutathion. Après une courte période de tremblements, l'animal se redresse et, à 15 h. 10, il est redevenu normal.

Expérience 6. — Cobaye mâle de 427 grammes :

A 10 h. 40, injection de 1 cm³ 6 de solution de cyanure de potassium N/50, soit 0 mg. 864 d'acide cyanhydrique, correspondant à 2 mg. par kilo d'animal.

Les symptômes d'intoxication apparaissent à 10 h. 45; nous injectons 4 mg. 85 de glutathion correspondant, comme dans les essais précédents, à Q. M./2 par rapport au cyanure de potassium; 40 minutes après l'injection, le Cobaye était redevenu normal. Il a survécu.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats de ces expériences. Les doses de glutathion injectées aux Cobayes étaient la moitié de la quantité équimoléculaire correspondant à l'acide cyanhydrique.

N° de l'expérience	Poids du Cobaye	Quantité de CNH injectée par kg.	Heure de l'injection	Heure du début des symptômes de l'intoxication	Heure de l'injection de G—SH	Quantité de GSH injectée par kg et correspondant à Q. M./2	Résultat
1	320 g.	1 mg. 25	17 h. 28	17 h. 31	17 h. 33	7 mg. 10	survie
2	390 g.	1 mg. 25	17 h.	17 h. 3	17 h. 5	7 mg. 10	survie
3	347 g.	1 mg. 50	11 h. 14	11 h. 16	11 h. 19	8 mg. 52	survie
4	600 g.	2 mg.	17 h. 23	17 h. 30	17 h. 40	11 mg. 37	survie
5	432 g.	2 mg.	14 h. 30	14 h. 34	14 h. 40	11 mg. 37	survie
6	427 g.	2 mg.	10 h. 40	10 h. 45	10 h. 48	11 mg. 37	survie

De l'ensemble de ces expériences, nous avons pu déduire que, pour les doses d'acide cyanhydrique voisines de la dose toxique (1 mg. 25 à 1 mg. 50 et même 2 mg.), **l'injection de glutathion arrête l'intoxication cyanhydrique.** Il suffit d'injecter une quantité de glutathion correspondant à Q. M./2 par rapport au cyanure de potassium.

Il convient de noter que les Cobayes que nous avons signalés comme ayant survécu ne présentaient plus les jours suivants le moindre symptôme d'intoxication.

Des doses inférieures à Q. M./2, injectées au moment des phénomènes d'asphyxie, quand le Cobaye n'a plus de réflexes oculaires, ne suffisent pas toujours à enrayer l'intoxication, provoquée par des quantités d'acide cyanhydrique supérieures à la dose toxique.

C'est ainsi que nous avons injecté, à 17 h. 25, à un Cobaye femelle de 357 grammes, 0 mg. 714 d'acide cyanhydrique, soit 2 mg. par kilog. Au moment où le Cobaye est tombé sur le flanc et ne présentait plus de réflexes oculaires, nous avons injecté 2 mg. 09 de glutathion, soit Q. M./3 par rapport au cyanure de potassium.

Le Cobaye est mort néanmoins, par asphyxie, à 17 h. 35.

IV

**Recherche des variations du taux du
glutathion dans l'intoxication
cyanhydrique, avec ou
sans administration de glutathion**

Nous venons de constater que des injections de glutathion permettent de lutter contre l'intoxication cyanhydrique chez le Cobaye. Il serait intéressant de savoir quel est le mécanisme de cette action antitoxique du glutathion.

D'après les travaux de différents auteurs, le mécanisme de la désintoxication cyanhydrique par les dérivés soufrés proviendrait de ce que ces dérivés transformeraient l'acide cyanhydrique en sulfocyanures non toxiques. Pour Lang (238), par exemple, l'organisme lutterait contre l'intoxication en conjuguant le groupe (CN—) avec un groupe sulfuré pour former CN—SH, et cette formation serait facilitée et accrue par l'introduction d'un composé soufré.

Il résulterait des expériences de Desgrez (89) et de Bedel (17) que, lorsque la protection par les dérivés soufrés n'est pas efficace, c'est que le composé formé est à son tour toxique. Toutefois, on n'a jamais retrouvé de sulfocyanure chez le Pigeon, intoxiqué par l'acide cyanhydrique et ayant reçu une injection d'hyposulfite de sodium. D'autre part, l'hyposulfite de sodium pro-

tège de l'intoxication par des nitriles avec lesquels, *in vitro*, il est incapable de former des sulfocyanures.

D'après Bodansky et Meyer (52), que l'on donne du cyanure ou du sulfocyanure de potassium à des sujets, on retrouve toujours la même quantité de sulfocyanate dans la salive. Mais si, en même temps, on donne de la cystine, le pourcentage de sulfocyanate est un peu plus élevé. Quand on administre du cyanure de potassium et de la cystine, dissous dans une solution de carbonate de soude, il se forme du sulfocyanate de potassium et de la cystéine. Pour ces auteurs, la quantité de sulfocyanure formée dépend de la quantité de cystine présente et serait indépendante de la quantité de cyanure de potassium ajoutée. Ces faits seraient un argument en faveur de la transformation physiologique de (CN—) en (SCN—).

Si la désintoxication cyanhydrique provient de la transformation des cyanures en sulfocyanures, on est amené à penser que les constituants sulfurés cellulaires, tels que le glutathion, doivent jouer dans ce phénomène un rôle de premier plan. On peut concevoir que la teneur en composés soufrés des différents organes doive varier dans l'intoxication cyanhydrique.

Handowski (148) a relevé dans les muscles de Lapins, soumis à une intoxication par l'acide cyanhydrique, un accroissement du taux du glutathion libre. Par contre, Blanchetière et Binet (41), dans des conditions analogues, n'ont pas trouvé de modifications du taux du glutathion. Il nous a donc paru intéressant d'étudier les variations du taux du glutathion dans les différents organes, au cours de l'intoxication cyanhydrique.

Nous avons tout d'abord effectué des dosages de glutathion dans les organes d'un Cobaye normal. Nous avons répété ces dosages sur des animaux ayant subi l'intoxication cyanhydrique. Nous résumons les résultats obtenus dans les tableaux ci-dessous.

Dans ces tableaux, le glutathion est exprimé en milligrammes pour 100 grammes d'organes. Les résultats mentionnés représentent les moyennes des différents dosages effectués.

Les Cobayes normaux ont été tués par saignée au cœur.

TENEURS EN GLUTATHION
DES ORGANES DE COBAYES NORMAUX

ORGANES PRELEVES	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port G-SH
	G	G'	G	G'	G	G'	GT
Foie	167	289	178	301	11	12	0,96
Reins	141	213	142	215	1	2	0,99
Cœur	83	130	85	134	2	4	0,97
Muscles de l'abdomen	26	41,7	27	41,7	1	0	1
Ovaires	182	238	318	397	136	159	0,75
Testicules	141	220,5	168	256	27	35,5	0,86
Surrénales	303	460	548	789	245	329	0,58
Thyroïdes	192	384	358	575	166	191	0,67
Rate	235	346	241	354	6	8	0,97
Poumons	102	156,5	102,5	157,5	0,5	1	0,99
Cerveau	65,5	104	72	112	6,5	8	0,92
Sang	41	64,5	53	80,2	12	15,7	0,80

Dans le second groupe d'expériences, les Cobayes ont reçu de l'acide cyanhydrique à la dose de 2 mg. par kilog. La mort est survenue, en moyenne, quinze minutes après l'injection; les animaux ont été autopsiés immédiatement et leurs organes prélevés.

TENEURS EN GLUTATHION DES ORGANES DE COBAYES
AYANT SUBI L'INTOXICATION CYANHYDRIQUE

ORGANES PRÉLEVÉS	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port G-SH GT
	G	G'	G	G'	G	G'	
Foie	141,5	293	142,1	295,6	0,6	2,6	0,99
Reins	112	195,5	112	196	0	0,5	1
Cœur	74	116,6	74	116,9	0	0,3	1
Muscles de l'abdomen	24,8	43,4	24,9	43,5	0,1	0,1	0,99
Ovaires	191	243,8	340,5	403	149,5	159,2	0,53
Testicules	153	224	189	263	36	39	0,80
Surrénales	301,6	399,7	511,7	625,7	210,1	226	0,58
Thyroïdes	185,9	388	373	597	187,1	209	0,49
Rate	214	277,3	229,8	295,3	15,8	18	0,94
Poumons	97,5	163	97,8	163,2	0,3	0,2	0,99
Cerveau	62,7	102,9	63,9	105	1,2	2,1	0,98
Sang	42,4	64	53,4	81,3	11	17,3	0,79

Nous voyons donc qu'il n'y a pas de différences appréciables entre le taux du glutathion dans les divers organes du Cobaye normal et dans ceux du Cobaye intoxiqué par l'acide cyanhydrique. On pourrait penser qu'il

en serait autrement si on injectait du glutathion à l'animal ayant subi l'intoxication cyanhydrique. Aussi avons-nous cru utile de voir, tout d'abord, si le taux du glutathion dans les organes du Cobaye variait lorsqu'on lui injectait du glutathion. Les résultats obtenus, condensés dans le tableau ci-dessous, prouvent que la teneur en glutathion des divers organes ne varie pas sensiblement.

Les Cobayes soumis à ces expériences ont reçu 2 mg. 27 de glutathion par kilog d'animal. Ils ont été sacrifiés par saignée au cœur, quinze minutes après l'injection.

TENEURS EN GLUTATHION DES ORGANES DE COBAYES
AYANT REÇU DU GLUTATHION

ORGANES PRELEVES	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port G-SH GT
	G	G'	G	G'	G	G'	
Foie	173,4	301,	184,5	313,9	11,1	12,9	0,94
Reins	132	216,5	133,6	218,7	1,6	2,2	0,98
Cœur	80,7	124	81,5	128,1	0,8	4,1	0,99
Muscles de l'abdomen	39,2	60	40	60,9	0,6	0,9	0,98
Ovaires	165,7	247	301,7	384	136	137	0,54
Surrénales	287	435	503	683,5	216	248,5	0,57
Testicules	134,8	213,7	172	264,9	37,2	51,2	0,78
Thyroïdes	141,8	339,2	298	512	156,2	172,8	0,48
Rate	198	402,8	209,2	416	11,2	13,2	0,94
Poumons ...	97,5	148	98,8	150,5	1,3	2,5	0,98
Cerveau ...	58,1	102,5	63,1	109	5	6,5	0,92
Sang	42,7	67	53	81,5	10,3	14,5	0,80

Nous avons effectué les mêmes dosages chez des Cobayes préalablement intoxiqués par injection de 2 mg. d'acide cyanhydrique par kilog et ayant reçu du glutathion en proportion telle qu'ils aient pu survivre, et correspondant à Q. M./2, par rapport au cyanure. Les animaux ont été sacrifiés par saignée au cœur, 15 à 20 minutes après l'injection d'acide cyanhydrique, et nous avons dosé le glutathion dans leurs organes. Voici le tableau des résultats obtenus et qui représentent la moyenne d'une série d'expériences.

TENEURS EN GLUTATHION DES ORGANES DE COBAYES,
INTOXIQUÉS PAR L'ACIDE CYANHYDRIQUE
ET AYANT REÇU DU GLUTATHION

ORGANES PRÉLEVÉS	Glutathion réduit		Glutathion total exprimé en glutathion réduit		Glutathion oxydé exprimé en glutathion réduit		Rap- port GSH
	G	G'	G	G'	G	G'	GT
Foie	165,7	301,9	179,6	316	13,9	14,1	0,92
Reins	128	198	128	199,1	0	0,1	1
Cœur	81,5	126,2	82,3	129	0,8	2,8	0,99
Muscles de l'abdomen ..	43	65,1	43,2	67,2	0,2	2,1	0,99
Ovaires	189	256,3	325,1	393,6	136,1	137,3	0,58
Testicules	153	234,5	198	285,9	45	51,4	0,77
Surrénales	313	423	487	601,5	174	178,5	0,64
Thyroïdes	153	343,1	289,3	507	136,3	163,9	0,52
Rate	203,6	409	208,4	415,9	4,8	6,9	0,97
Poumons	103,5	174	104,2	181,6	0,7	7,6	0,99
Cerveau	75,9	109,7	77	111,7	1,1	2	0,98
Sang	41,5	62,3	51,6	80,9	10,1	18,6	0,80

Il nous est donc permis de dire que le taux du glutathion dans les organes du Cobaye ne varie guère, que celui-ci ait reçu des injections de glutathion, qu'il ait été intoxiqué par l'acide cyanhydrique ou qu'il ait reçu successivement du cyanure de potassium et du glutathion.

Nous avons alors recherché s'il n'y aurait pas de variations dans les quantités de cyanures et de sulfocyanures retrouvées dans les organes du Cobaye, soit après intoxication mortelle par l'acide cyanhydrique, soit dans le cas d'intoxication combattue efficacement par injection de glutathion. Préalablement, il nous a fallu faire choix d'une méthode de dosage des cyanures et sulfocyanures.

V

Recherche d'une microméthode de dosage des cyanures et des sulfocyanures

Notre premier soin fut de passer en revue les méthodes de dosage les plus couramment utilisées. Nous ne détaillerons pas les différentes techniques suffisamment connues, nous bornant à indiquer les résultats qu'elles nous ont fournis pour le dosage des très petites quantités de cyanure que nous avons à apprécier.

A. — ETUDE DES METHODES USUELLES.

1. Méthode argentimétrique en milieu ammoniacal (Denigès).

Nous avons essayé successivement :

- a)* La méthode indirecte, c'est-à-dire la technique de dosage en retour;
- b)* La méthode directe, en recevant le distillat dans l'ammoniaque et en y dosant le cyanure par addition d'une solution argentique titrée;
- c)* Le procédé à l'iodure d'argent (technique de Chelle).

Nous avons constaté que les deux premières méthodes n'étaient pas applicables au dosage de petites quantités de cyanure, de l'ordre du centième de milligramme. A cette dilution, le cyanure donne bien naissance à un précipité avec l'azotate d'argent, mais cette réaction ne peut guère être utilisée pour un dosage. En effet, l'azotate d'argent très dilué, N/1.000 par exemple, ne donne plus d'opalescence avec le cyanure; d'autre part, on ne peut pas songer à utiliser une solution centinormale d'azotate d'argent, car la première goutte ajoutée donnerait déjà le louche marquant la fin du dosage.

En ce qui concerne la troisième méthode, elle ne donne pas davantage satisfaction. On emploie comme réactif une émulsion ammoniacale d'iodure d'argent. Le point délicat du procédé, et même son gros inconvénient, est, là aussi, de saisir le moment précis où apparaît le louche indiquant l'excès d'iodure d'argent qui marque le terme de la réaction.

2. Méthode iodométrique de Fordos et Gélis.

Cette méthode est d'une très grande sensibilité, mais elle n'est pas applicable lorsqu'on se trouve en présence d'un grand nombre de matières organiques réductrices. Or, c'est précisément le cas lorsqu'on analyse des viscères. Nous avons donc, pour cette raison, délaissé cette technique.

3. Méthode de Lavialle et Varenne (240).

Cette méthode est une modification de la technique basée sur la transformation de l'acide cyanhydrique en acide sulfocyanique et en sulfocyanate ferrique.

Le mode opératoire préconisé par Lavialle et Varenne est le suivant.

La solution contenant l'acide cyanhydrique est additionnée à froid de sulphydrate d'ammoniaque, chauffée et maintenue à douce ébullition, pendant cinq minutes, dans une capsule de porcelaine, puis évaporée au bain-

marie jusqu'à réduction à 1 cm³ environ. La quantité de sulfhydrate employée doit être suffisante pour laisser à la liqueur finale une très légère coloration jaune. Le résidu est repris par 9 cm³ d'eau environ, additionné de X gouttes d'acide chlorhydrique concentré, agité et additionné de 20 cm³ d'éther. Le mélange, agité violemment dans une ampoule à décantation, est mis au repos. On renouvelle deux fois l'épuisement à l'éther, avec 10 cm³ chaque fois. Les liqueurs éthérées sont évaporées à la température ordinaire, et le faible résidu aqueux restant est traité par le perchlorure de fer aussitôt après la disparition de l'odeur de l'éther.

Le dosage se termine par un titrage à l'aide d'une liqueur argentique. On retrouve donc les mêmes inconvénients que lorsqu'on utilise la méthode de Denigès.

Les autres méthodes de dosage des cyanures : méthode cuprométrique de Buignet, méthode pondérale à l'état de cyanure d'argent, etc., ne peuvent être appliquées que pour des doses de cyanures beaucoup plus élevées.

Nous avons donc songé à utiliser une méthode colorimétrique reposant sur les réactions spécifiques des cyanures : réaction du bleu de Prusse, réaction du sulfo-cyanure ferrique, formation d'isopurpurate de potassium.

Nous avons d'abord cherché à utiliser la première de ces réactions, la coloration bleue nous paraissant préférable à la teinte rouge pour un dosage colorimétrique.

B. — ETUDE D'UN MICRODOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES CYANURES, FONDE SUR LA RÉACTION DU BLEU DE PRUSSE.

Nous sommes partie de la technique qualitative de Chelle.

Technique de Chelle, pour la recherche qualitative des cyanures. — Mettre dans un tube à essai 1 cm³ de solution cyanurée alcaline et une goutte de phthaléine du phénol. Ajouter goutte à goutte de l'acide sulfurique normal ou de titre voisin jusqu'à décoloration. Revenir

à la teinte rouge, c'est-à-dire rendre le milieu très faiblement alcalin en versant quelques gouttes d'une solution saturée à froid de borax. Ajouter alors une goutte d'une solution de sulfate ferreux à 2 p. 100. Agiter et attendre 3 à 4 minutes. (Il faut qu'après addition du sulfate ferreux, l'alcalinité du milieu persiste, sinon on rétablirait la teinte rouge par addition d'une goutte ou plus de solution de borax.)

On acidifie ensuite par quatre ou cinq gouttes d'acide chlorhydrique pur. On obtient ainsi une teinte bleue, intense et immédiate, avec 0 mg. 10 et même 0 mg. 05 d'acide cyanhydrique. Quelques minutes sont nécessaires pour percevoir une teinte bleue très nette avec 0 mg. 01 de cet acide dans la prise d'essai.

La teinte bleue atteint son maximum d'intensité après une demi-heure environ.

1. Sensibilité de la réaction.

Par cette méthode, 2 cm³ de solution N/1.000 de cyanure de potassium, complétés à 10 cm³ à l'aide d'eau distillée, donnent une coloration bleue pouvant à peine être susceptible de dosage colorimétrique. Or, ces 2 cm³ correspondent à 0 mg. 054 d'acide cyanhydrique; par conséquent, 0 mg. 054 d'acide cyanhydrique, dilués dans 10 cm³ de distillat, donnent une teinte bleue juste suffisante. Une dose moitié plus faible, soit 0 mg. 027 d'acide cyanhydrique, dans 10 cm³ de distillat, donnent une teinte bleue à peine perceptible.

Pour des quantités d'acide cyanhydrique supérieures à 0 mg. 054, la teinte bleue augmente d'intensité et devient telle qu'il est facile de l'apprécier quantitativement.

La limite de sensibilité de la méthode paraît donc être, pour le dosage colorimétrique, de 0 mg. 054 d'acide cyanhydrique pour 10 cm³ de distillat. Mais si, pour une solution de même titre, on opère, non plus sur 10 cm³, mais sur 1 cm³ de distillat, soit sur 0 mg. 0054 d'acide cyanhydrique, on obtient une coloration appréciable. Par conséquent, nous pouvons dire que la sensibilité de

cette méthode colorimétrique est de 0 mg. 0051 d'acide cyanhydrique par centimètre cube. Or, il est aisé, dans les dosages toxicologiques, de ne pas dépasser ce volume de distillat, l'acide cyanhydrique passant dès le début de l'opération; on pourrait, d'ailleurs, au besoin, faire plusieurs distillations.

2. Recherche de la relation entre l'intensité de la teinte et la quantité d'acide cyanhydrique.

a) Dans une série de tubes à essais, nous avons mis respectivement :

1 cm³; 2 cm³; 2 cm³ 25; 2 cm³ 50; 2 cm³ 75; 3 cm³; 3 cm³ 25; 3 cm³ 50; 3 cm³ 75; 4 cm³; 4 cm³ 25; et 4 cm³ 50 de solution N/1.000 de cyanure de potassium.

Nous avons ajouté de l'eau distillée, de façon à avoir uniformément 10 cm³ de liquide. La réaction nous a donné une teinte bleue très nette dans tous les tubes, sauf dans le premier qui ne contenait que 0 mg. 027 d'acide cyanhydrique. La teinte bleue atteint son maximum d'autant plus lentement que la quantité d'acide cyanhydrique est plus faible. C'est ainsi que, dans les tubes contenant moins de 0 mg. 081 d'acide cyanhydrique, le maximum n'est pas encore atteint après une heure. Une troisième observation est à faire. Ce n'est que pour une dose d'acide cyanhydrique supérieure à 0 mg. 081 que la coloration augmente régulièrement d'intensité avec la proportion d'acide. Cette augmentation d'intensité paraît croître plus rapidement que la quantité de cyanure. Les lectures faites au colorimètre ont été les suivantes :

					Hauteurs colorimétriques.
3 cm ³ 50 de solution N/1.000 de CNK. . . .					11
3 cm ³ 75	—	—	—		9,6
4 cm ³	—	—	—		7,6
4 cm ³ 25	—	—	—		4,8
4 cm ³ 50	—	—	—		4

b) Nous avons repris le même essai, mais en ne complétant qu'à 5 cm³ le volume total du liquide et en modifiant les doses de cyanure.

Les tubes contenaient respectivement :

0 cm³ 50; 0 cm³ 75; 1 cm³; 1 cm³ 25; 1 cm³ 50; 1 cm³ 75; 2 cm³; 2 cm³ 25; 2 cm³ 50; 2 cm³ 75; 3 cm³ et 3 cm³ 25 de solution N/1.000 de cyanure de potassium.

Le tube contenant 1 cm³, soit 0 mg. 027 d'acide cyanhydrique, dans 5 cm³ d'eau distillée, donnait déjà une coloration bleue, mais trop faible pour pouvoir être appréciée colorimétriquement.

Du tube contenant 1 cm³ 50 à celui contenant 2 cm³ 75, la coloration avait une intensité croissante.

Les lectures faites au colorimètre ont été les suivantes :

					Hauteurs colorimétriques.
1 cm ³ 50 de solution N/1.000 de CNK. . . .					9,1
1 cm ³ 75	—	—	—		8,2
2 cm ³ 25	—	—	—		7,5
2 cm ³ 50	—	—	—		5,9
2 cm ³ 75	—	—	—		5

On peut conclure que l'intensité de la coloration n'est pas proportionnelle à la quantité d'acide cyanhydrique existant dans la liqueur, mais que, dans des conditions identiques, une plus grande proportion de cyanure va de pair avec une coloration de plus grande intensité (ceci a été constamment vérifié dans la suite) et qu'une différence de 0 mg. 007 d'acide cyanhydrique est très appréciable à l'œil, sans avoir à faire usage du colorimètre.

3. Recherche de la constance de la coloration pour une dose donnée.

a) Nous avons effectué la réaction du bleu de Prusse dans cinq tubes contenant chacun 2 cm³ de solution de cyanure de potassium N/1.000. Nous avons complété à

5 cm³ avec l'eau distillée. Nous avons mis exactement le même nombre de gouttes de chacun des réactifs. Nous avons effectué au colorimètre les lectures suivantes :
10; 10; 9,6; 9,9; 9,8.

b) Nous avons refait le même essai avec 3 cm³ de la solution de cyanure N/1.000. Nous avons de même dilué à 5 cm³, et les lectures ont été les suivantes :
5; 4,8; 4,7; 4,9.

Les écarts de lecture, quoique appréciables, nous paraissent satisfaisants.

Nous pouvons donc dire que, dans des conditions identiques, la coloration est à peu près constante pour une dose donnée.

c) Ces essais ont été renouvelés en modifiant les conditions de la réaction.

1° *Variations d'alcalinité.* — Dans cinq tubes, nous avons mis 5 cm³ de solution N/1.000 de cyanure de potassium. Nous avons complété à 10 cm³ par addition d'eau distillée, puis nous avons ajouté à chaque tube une goutte de solution de phénolphthaléine.

Dans chacun d'eux, nous avons ajouté deux gouttes de solution décimorale d'acide sulfurique, quantité suffisante pour décolorer la phtaléine, puis respectivement 4, 8, 12, 16, 32 gouttes de solution saturée de borate de soude. Les colorations obtenues étaient différentes et la lecture au colorimètre a donné les chiffres suivants :

Hauteurs
colorimétriques.

Pour 4 gouttes de solution saturée de borate de soude	5
Pour 8 gouttes de solution saturée de borate de soude	6
Pour 12 gouttes de solution saturée de borate de soude	6,5
Pour 16 gouttes de solution saturée de borate de soude	8,4
Pour 32 gouttes de solution saturée de borate de soude	24

La variation de coloration s'accroît de plus en plus, elle est bien due à la variation d'alcalinité et non à la quantité de borate de soude elle-même. En effet, un essai effectué en acidifiant avec deux gouttes d'acide sulfurique normal et en alcalinisant en retour avec trente gouttes de solution de borate de soude donne la même intensité de coloration que l'essai témoin, où nous avons mis deux gouttes d'acide sulfurique décimormal, puis trois gouttes de solution de borate de soude.

2° *Doses variables de solution de sulfate ferreux.* — Toutes conditions restant identiques, dans des tubes contenant 10 cm³ de solution N/2.000 de cyanure de potassium, nous avons mis respectivement 1, 2, 3, 4 et 5 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 pour 100. Nous avons effectué les lectures colorimétriques suivantes :

	Hauteurs colorimétriques.
1 goutte de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	20
2 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	7
3 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	7
4 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	6,9
5 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	7
6 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	7

Nous avons recommencé ces essais en prenant 2 cm³ de cyanure de potassium N/1.000 et en diluant à 5 cm³ avec de l'eau distillée.

Les lectures colorimétriques ont été les suivantes :

	Hauteurs colorimétriques.
1 goutte de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	10
2 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	9,5
3 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	9,6
4 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	9,4
5 gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100	9,5

Il convient de noter que les tubes contenant 4 ou 5 gouttes de solution de sulfate ferreux ont eu une floculation du précipité beaucoup plus rapide.

Nous pouvons donc conclure qu'un excès de solution de sulfate ferreux semble avoir peu d'influence sur la réaction, alors qu'une insuffisance de ce corps provoque une différence de coloration très importante.

Nous mettrons donc : 2 gouttes pour 5 cm³ de liqueur;
3 gouttes pour 10 cm³ de liqueur.

3° *Doses variables d'acide chlorhydrique.* — Un essai comparable aux précédents a été effectué, mais en faisant varier les doses d'acide chlorhydrique; il a donné les résultats ci-après :

	Hauteurs colorimétriques.
1 goutte d'acide chlorhydrique	13
2 — — — — —	10
3 — — — — —	10
4 — — — — —	9,8
5 — — — — —	9,3
6 — — — — —	12
7 — — — — —	15

La variation des doses d'acide chlorhydrique a donc une légère influence sur l'intensité de la coloration. Nous adopterons la dose de 4 ou 5 gouttes d'acide chlorhydrique pour 5 cm³ de distillat.

Les mêmes essais ont été renouvelés en prenant une série de tubes contenant 10 cm³ de solution N/2.000 de cyanure de potassium. Voici les résultats :

						Hauteurs colorimétriques.
2	gouttes d'acide chlorhydrique.....					25
4	—	—	—	—		25
6	—	—	—	—		22
8	—	—	—	—		22
10	—	—	—	—		21
12	—	—	—	—		21

La coloration bleu franc pour les tubes contenant 10 ou 12 gouttes d'acide chlorhydrique est de plus en plus verdâtre, à mesure que le nombre de gouttes d'acide diminue.

Pour 10 cm³ de distillat, il est donc nécessaire de mettre 10 gouttes d'acide chlorhydrique.

4. Technique utilisée.

A la suite de ces divers essais, nous avons adopté la technique suivante.

Soit n cm³ le volume recueilli par distillation.

On met une goutte de solution de phénolphtaléine et, goutte à goutte, une solution décimale d'acide sulfurique jusqu'à décoloration. On revient à une teinte rose, en ajoutant goutte à goutte une solution saturée de borate de soude. On verse alors $\frac{n}{3}$ gouttes de solution de sulfate ferreux à 2 p. 100.

On agite et on ramène à une légère alcalinité, s'il est nécessaire, par addition goutte à goutte de la solution saturée de borate de soude.

On acidifie alors par n gouttes d'acide chlorhydrique pur. Après 30 minutes, on effectue la lecture colorimétrique.

5. Vérification de cette technique.

Nous avons vérifié cette technique en effectuant les essais suivants :

1° En procédant exactement selon la méthode que nous venons d'indiquer, on obtient régulièrement des colorations identiques pour un même titre. Dans une série de tubes, nous avons mis respectivement : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cm³ de solution N/2.000 de cyanure de potassium. Nous avons obtenu une coloration bleue parfaitement identique dans les dix tubes.

2° Dans un second groupe d'essais, nous avons distillé 50 cm³ de solution N/10.000 de cyanure de potassium. Nous avons recueilli 5 cm³ de distillat et nous avons effectué le dosage colorimétrique selon la technique adoptée. Le chiffre théorique d'acide cyanhydrique étant 0,135, nous avons trouvé dans les divers essais : 0,126; 0,130; 0,130; 0,135; soit une moyenne de 0,130.

3° A 10 cm³ d'une solution N/2.000 de cyanure de potassium, nous avons ajouté 40 cm³ de sérum sanguin. Nous avons distillé et recueilli 5 cm³ de distillat. Le dosage colorimétrique nous a donné dans les différents tubes une teneur moyenne de 0,128.

4° A 10 cm³ de solution N/2.000 de cyanure de potassium, nous avons ajouté 40 cm³ de sang. Nous avons distillé et recueilli 5 cm³ de distillat. Le dosage de l'acide cyanhydrique nous a fourni les chiffres suivants :

0,128; 0,133; 0,132; 0,130.

5° Enfin, nous avons broyé des viscères; nous les avons additionnés de 10 cm³ de solution N/2.000 de cyanure de potassium. Nous avons procédé à la distillation et recueilli 5 cm³ de distillat. Le dosage colorimétrique nous a donné des résultats aussi satisfaisants que dans les essais précédents, avec une moyenne de : 0 mg. 128 d'acide cyanhydrique.

C. — MODE OPERATOIRE SUIVI POUR LE DOSAGE DE CYANURES ET DE SULFOCYANURES DANS LES VISCERES.

Les organes, dès leur prélèvement, sont placés dans des capsules plongeant dans la glace. Ils sont broyés, avec de la glace, puis placés dans un ballon avec quelques grains de pierre ponce et 10 pour 100 de leur poids d'acide phosphorique. On procède à la distillation, en ayant soin de recueillir le distillat dans un verre plongeant dans la glace et contenant 2 cm³ d'eau distillée, additionnée d'une goutte de lessive de soude et d'une goutte de solution de phénolphtaléine.

Il convient de chauffer très doucement, pour que l'acide cyanhydrique passe sans trop d'eau. On arrête la distillation quand on a dans le verre 5 cm³ de solution. On vérifie si les portions qui passent ensuite à la distillation sont bien exemptes d'acide cyanhydrique.

On procède alors, sur le distillat, au dosage colorimétrique selon la technique indiquée plus haut.

Les sulfocyanures ne passent pas à la distillation; pour les doser, on traite la bouillie d'organes encore chaude par environ 5 p. 100 du poids des viscères d'acide picrique en poudre. On mélange et on laisse au repos 15 à 18 heures. On ajoute alors, par 10 grammes d'organes traités, 1 cm³ de solution aqueuse à 5 p. 100 de chromate de potassium et 2 cm³ de solution à demi-volume d'acide sulfurique. Sous l'influence de ce mélange oxydant, les sulfocyanures donnent de l'acide cyanhydrique. On distille alors comme précédemment et, dans le distillat, on dose colorimétriquement l'acide cyanhydrique.

Dosage des cyanures et des sulfocyanures dans les organes des animaux intoxiqués par l'acide cyanhydrique

Cette technique étant mise au point, nous avons adopté le protocole expérimental suivant.

Les Cobayes sont autopsiés et nous prélevons : foie, reins avec surrénales, poumons, cœur et rate. Ces organes sont immédiatement placés dans un récipient plongeant dans la glace; ils sont broyés au hachoir à la température de 0°, repris par l'eau froide, puis placés dans le ballon et soumis à la distillation, selon la technique précédemment indiquée.

Nous avons tenu à contrôler en premier lieu l'absence de cyanures et de sulfocyanures dans les organes de Cobayes normaux. Nous avons, dans ce but, examiné un lot de cinq animaux pesant respectivement 450, 527, 385, 468 et 510 grammes. L'analyse des organes n'a pas révélé la moindre trace de cyanure ou de sulfocyanure.

Nous avons alors injecté des doses variables de cyanure de potassium à un certain nombre d'animaux et nous avons dosé l'acide cyanhydrique retrouvé dans leurs organes. Voici quelques-unes des expériences faites.

Expérience 1. — Cobaye mâle de 310 grammes :

A 15 heures, nous avons injecté 0 mg. 3875 d'acide cyanhydrique, soit 1 mg. 25 par kilogramme d'animal. Quelques minutes après, le Cobaye a présenté les symptômes caractéristiques de l'intoxication cyanhydrique : convulsions, agitation et asphyxie. Il est mort à 15 h. 15, nous l'avons immédiatement autopsié et nous avons prélevé les organes dont le poids était de 28 grammes. A l'analyse, nous avons retrouvé dans le distillat, 0 mg. 105 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et 0 mg. 092 à l'état de sulfocyanure.

Expérience 2. — Cobaye femelle de 317 grammes :

A 11 h. 45, injection de 0 cm³ 90 de solution de cyanure de potassium N/50, neutralisée, soit 1 mg. 50 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal. Le Cobaye meurt à 12 heures après les accidents habituels de l'intoxication. On retrouve dans le distillat 0 mg. 084 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, et 0 mg. 085 à l'état de sulfocyanure.

Expérience 3. — Cobaye femelle de 310 grammes :

A 10 h. 5, injection sous-cutanée de 0 cm³ 17 de solution de cyanure de potassium N/10 neutralisée, soit 1 mg. 5 d'acide cyanhydrique par kilog d'animal. A 10 h. 07, début des symptômes : titubation, convulsions. L'animal se couche ensuite sur le côté et meurt par asphyxie. Le cœur ne s'arrête qu'à 10 h. 25. Autopsie, prélèvement des organes (29 g.).

Le dosage révèle la présence de 0 mg. 090 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et de 0 mg. 058 à l'état de sulfocyanure.

Expérience 4. — Cobaye femelle de 420 grammes :

A 16 heures, injection sous-cutanée de 0 mg. 840 d'acide cyanhydrique, soit 2 mg. par kilog d'animal.

A 16 h. 05 début des symptômes. A 16 h. 15, mort.

L'urine a été recueillie à 16 h. 05 et à 16 h. 10; les deux échantillons renfermaient des traces de cyanure.

Nous avons pratiqué l'autopsie, prélevé les organes pesant 32 g. et procédé au dosage des cyanures et des sulfocyanures.

Nous avons retrouvé 0 mg. 081 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et 0 mg. 074 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 5. — Cobaye mâle de 295 grammes :

A 17 h. 50, injection sous-cutanée de 0 mg. 576 d'acide cyanhydrique (1 cm³ 06 de solution de cyanure de potassium N/50 neutralisée), ce qui correspond à 2 mg. par kilog d'animal.

Mort du Cobaye à 18 h. 20.

Autopsie, prélèvement des organes (28 g.).

Le dosage nous a révélé la présence de 0 mg. 058 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et de 0 mg. 067 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 6. — Cobaye mâle de 347 grammes :

A 9 h. 51, injection sous-cutanée de 0 mg. 676 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 25 de solution de cyanure de potassium N/10 neutralisée), ce qui correspond à 2 mg. par kilog d'animal.

A 9 h. 53, début des symptômes : titubation.

A 10 h. 01, mort (les réflexes sont abolis avant l'arrêt du cœur). Autopsie immédiate. Prélèvement et traitement habituel des organes (31 grammes).

Présence de 0 mg. 067 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et de 0 mg. 082 à l'état de sulfocyanure.

Expérience 7. — Cobaye femelle de 225 grammes :

A 10 h. 24, injection sous-cutanée de 0 mg. 687 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 26 de solution de cyanure de potassium N/10 neutralisée), ce qui correspond à 2 mg. 50 par kilog d'animal.

A 10 h. 26, début des symptômes, titubation, puis convulsions violentes, l'animal fait un bond de 25 cm. environ, puis retombe, se couche sur le flanc et meurt par asphyxie à 10 h. 33. Le cœur s'arrête alors, mais dès 10 h. 29 l'animal ne respirait plus et n'avait plus de réflexes.

L'autopsie est pratiquée immédiatement, les organes sont prélevés (27 g.), puis traités.

On ne retrouve que des cyanures : 0 mg. 054 exprimés en acide cyanhydrique.

Expérience 8. — Cobaye femelle de 430 grammes :

A 16 h. 36, injection sous-cutanée de 1 mg. 30 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 48 de solution de cyanure de potassium N/10 neutralisée), ce qui correspond à 3 mg. par kilog d'animal.

A 16 h. 37, début des symptômes, l'animal se dresse sur son séant, retombe et ceci trois ou quatre fois, puis il s'étend, respire deux ou trois fois et meurt trois minutes après l'injection. Pas de lésions à l'autopsie. Les organes prélevés (42 g.), sont traités selon la technique adoptée.

Nous avons retrouvé 0 mg. 120 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et 0 mg. 047 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 9. — Cobaye mâle de 550 grammes :

A 9 h. 17, injection sous-cutanée de 1 mg. 89 d'acide cyanhydrique (0 cm³ 7 de solution de cyanure de potassium N/10, neutralisée), ce qui correspond à 3 mg. 50 par kilog d'animal.

A 9 h. 20, début des symptômes, petites convulsions, puis l'animal s'étend, se débat un peu et reste immobile, la respiration étant difficile.

Il meurt à 9 h. 29, soit 12 minutes après l'injection.

Aucune lésion visible à l'autopsie.

Nous avons prélevé les organes dont le poids total était de 44 g. Nous avons retrouvé dans le distillat 0 mg. 158 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, et 0 mg. 082 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 10. — Cobaye femelle de 367 grammes :

A 10 h. 05, nous avons injecté par voie sous-cutanée 1 mg. 62 d'acide cyanhydrique, ce qui correspond à 4 mg. 40 par kilog d'animal. Trente secondes après l'injection, l'animal est pris de convulsions, il fait des bonds de vingt centimètres, puis il retombe et meurt pas asphyxie après trois minutes environ.

L'autopsie pratiquée immédiatement n'a révélé aucune lésion visible. Le poids des organes prélevés était de 35 g., dans lesquels nous avons retrouvé 0 mg. 187 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, et 0 mg. 096 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 11. — Cobaye mâle de 330 grammes :

A 15 h. 30, injection de 0 cm³ 61 de solution de cyanure de potassium N/50, soit 5 mg. d'acide cyanhydrique par kilog d'animal.

Mort rapide en deux ou trois minutes.

L'urine émise au moment de la mort, ne contenait pas de sulfocyanure.

Autopsie, prélèvement des organes (32 g.). Nous avons retrouvé 0 mg. 163 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, et 0 mg. 075 sous forme de sulfocyanure.

Ces expériences sont résumées dans le tableau ci-dessous.

N° de l'expérience	Poids du Cobaye	Quantité injectée de CNH par kg	Heure de l'injection de CNH	Heure du début des symptômes de l'intoxication	Heure de la mort	Quantité de CNH retrouvée dans les organes	
						à l'état de cyanures	à l'état de sulfocyanures
1	310 g.	1 mg. 25	15 h.	15 h. 3	15 h. 15	0 mg. 105	0 mg. 092
2	317 g.	1 mg. 50	11 h. 45	11 h. 47	12 h.	0 mg. 084	0 mg. 085
3	310 g.	1 mg. 50	10 h. 5	10 h. 7	10 h. 25	0 mg. 090	0 mg. 058
4	420 g.	2 mg.	16 h.	16 h. 5	16 h. 15	0 mg. 081	0 mg. 074
5	295 g.	2 mg.	17 h. 50	17 h. 55	18 h. 20	0 mg. 058	0 mg. 067
6	347 g.	2 mg.	9 h. 51	9 h. 53	10 h. 1	0 mg. 067	0 mg. 082
7	225 g.	2 mg. 50	10 h. 24	10 h. 26	10 h. 33	0 mg. 054	0 mg. 000
8	430 g.	3 mg.	16 h. 36	16 h. 37	16 h. 39	0 mg. 120	0 mg. 047
9	550 g.	3 mg. 50	9 h. 17	9 h. 20	9 h. 29	0 mg. 158	0 mg. 082
10	367 g.	4 mg. 40	10 h. 5	10 h. 6	10 h. 8	0 mg. 187	0 mg. 092
11	330 g.	5 mg.	15 h. 30	15 h. 31	15 h. 32	0 mg. 163	0 mg. 075

Dans une seconde série d'expériences, nous avons effectué ces mêmes dosage de cyanure et de sulfocyanure sur des Cobayes ayant reçu de l'acide cyanhydrique, mais ayant résisté à l'intoxication grâce à l'administration de glutathion.

Expérience 1. — Cobaye mâle de 480 grammes :

Nous avons injecté, à 15 h. 18, par voie sous-cutanée, 0 mg. 40 d'acide cyanhydrique, soit 1 mg. 25 par kilogramme d'animal. A 15 h. 21, le Cobaye présente les premiers symptômes de l'intoxication, il titube et tombe sur le flanc. A 15 h. 23, nous injectons 1 cm³ 5 de solution de glutathion, soit 3 mg. 40. Le Cobaye est immédiatement pris de violents tremblements, vers 15 h. 45, il se redresse et paraît normal. Nous sacrifions alors l'animal, nous prélevons ses organes, dont le poids est de 36 g. L'analyse révèle la présence de 0 mg. 07 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, et 0 mg. 062 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 2. — Cobaye femelle de 380 grammes :

A 16 heures, injection sous-cutanée de 0 mg. 50 d'acide cyanhydrique, soit 1 mg. 25 par kilogramme d'animal. Les convulsions apparaissent dès 16 h. 03, et à 16 h. 05 le Cobaye tombe sur le côté. Nous lui injectons alors une solution contenant 2 mg. 70 de glutathion ; une minute après, il tremble, puis les troubles s'atténuent et, finalement, il reprend une attitude normale. Nous le sacrifions, l'analyse des organes, dont le poids est de 31 g., nous révèle la présence de 0 mg. 071 d'acide cyanhydrique dissimulé sous forme de sulfocyanure, mais nous ne décelons pas de trace de cyanure.

Expérience 3. — Cobaye mâle de 350 grammes :

A 15 h. 18, injection de 0 mg. 52 d'acide cyanhydrique, soit 1 mg. 50 par kilogramme d'animal. Les symptômes apparaissent, et quand l'animal se couche sur le flanc, nous lui injectons une solution contenant 2 mg. 98 de glutathion. Les réflexes oculaires, qui étaient nuls, redeviennent positifs, et à 15 h. 43, le Cobaye se redresse et prend une attitude normale. Nous le sacrifions ; ses viscères, pesant 29 g., sont analysés et nous ne retrouvons pas d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure, mais 0 mg. 053 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 4. — Cobaye femelle de 354 grammes :

Nous injectons, à 9 h. 25, 0 mg. 535 d'acide cyanhydrique, soit 1 mg. 50 par kilog d'animal. Symptômes habituels de l'intoxication, assez accentués; puis lorsque l'animal se couche sur le flanc; nous injectons une solution contenant 3 mg. 01 de glutathion. Malgré cela, l'animal meurt à 9 h. 35. Nous pratiquons immédiatement l'autopsie et l'analyse des viscères, dont le poids est de 31 g., révèle la présence de 0 mg. 091 d'acide cyanhydrique à l'état de cyanure et de 0 mg. 064 sous forme de sulfocyanure.

Expérience 5. — Cobaye mâle de 595 grammes :

A 10 h. 25, injection de 2 cm³ 2 de solution de cyanure de potassium N/50 neutralisée, ce qui correspond à 2 mg. d'acide cyanhydrique par kilog.

A 10 h. 28 apparaissent les symptômes de l'intoxication, et à 10 h. 35 nous injectons une solution contenant 6 mg. 80 de glutathion. Après la période habituelle de tremblements, le Cobaye se remet sur ses pattes et nous le sacrifions. Les organes pesant 40 g. ne contenaient pas de cyanure, mais ils renfermaient : 0 mg. 086 d'acide cyanhydrique à l'état de sulfocyanure.

Expérience 6. — Cobaye mâle de 430 grammes :

Nous injectons, à 10 h. 10, 0 mg. 864 d'acide cyanhydrique, soit 2 mg. par kilog. Nous observons les phénomènes de l'intoxication cyanhydrique et, à 10 h. 20, nous injectons une solution contenant 4 mg. 89 de glutathion. L'animal est redevenu normal au bout de 28 minutes, nous le sacrifions; ses organes pesant 33 g. ont été analysés. Nous n'avons trouvé aucune trace de cyanure, mais 0 mg. 062 d'acide cyanhydrique sous forme de sulfocyanure.

Expérience 7. — Cobaye mâle de 432 grammes :

Injection sous-cutanée de 0 mg. 865 d'acide cyanhydrique, soit 2 mg. par kilog d'animal. Immédiatement titubation, convulsions, puis après trois minutes, l'animal se cou-

che sur le flanc. Nous lui injectons alors une solution contenant 4 mg. 91 de glutathion et il redevient assez rapidement normal. Nous le sacrifions et ses organes dont le poids était de 36 grammes ont été analysés. Ils ne renfermaient pas de cyanure, mais contenaient : 0 mg. 071 d'acide cyanhydrique sous forme de sulfocyanure.

Le tableau ci-dessous résume les résultats de ces expériences.

N° de l'expérience	Poids du Cobaye	Quantité de CNH injectée par kg.	Heure de l'injection de CNH	Heure du début des symptômes de l'intoxication	Heure de l'injection de G-SH	Quantité de GSH injectée par kg et correspondant à Q.M./2	Résultat	Quantité de CNH retrouvée dans les organes	
								à l'état de cyanures	à l'état de sulfocyanures
1	480 g.	1 mg. 25	15 h. 18	15 h. 21	15 h. 23	7 mg. 10	survie	0 mg. 07	0 mg. 062
2	380 g.	1 mg. 25	16 h.	16 h. 3	16 h. 5	7 mg. 10	survie	0 mg.	0 mg. 071
3	350 g.	1 mg. 50	15 h. 18	15 h. 20	15 h. 23	8 mg. 52	survie	0 mg.	0 mg. 053
4	354 g.	1 mg. 50	9 h. 25	9 h. 26	9 h. 26	8 mg. 52	mort à 9 h. 35	0 mg. 091	0 mg. 064
5	595 g.	2 mg.	10 h. 25	10 h. 28	10 h. 35	11 mg. 37	survie	0 mg.	0 mg. 086
6	430 g.	2 mg.	10 h. 10	10 h. 15	10 h. 20	11 mg. 37	survie	0 mg.	0 mg. 062
7	432 g.	2 mg.	17 h. 10	17 h. 12	17 h. 18	11 mg. 37	survie	0 mg.	0 mg. 071

On constate donc chez les Cobayes ayant survécu à l'intoxication cyanhydrique, grâce à l'injection de glutathion :

1° L'absence ou la très faible proportion de cyanures dans les viscères;

2° Une proportion de sulfocyanures, retrouvée dans les viscères, comparable à celle retrouvée dans les organes des Cobayes morts par intoxication cyanhydrique sans avoir reçu d'injection de glutathion.

On ne peut donc pas invoquer la formation de sulfocyanures comme processus de l'action antidotique du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique.

VII

Mécanisme de l'action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique

La plupart des composés soufrés préconisés pour la désintoxication cyanhydrique exigent une période de latence pour l'obtention d'un résultat positif. Ils sont, en quelque sorte, plutôt préventifs.

Le glutathion, tout au contraire, agit en pleine crise d'intoxication, mieux, au moment même où elle va se terminer par la mort du sujet. Cependant, on ne peut invoquer, comme on l'a fait pour les autres composés essayés, l'effet favorable de la transformation des cyanures en sulfocyanures dans l'organisme. Traité ou non par le glutathion après intoxication cyanhydrique, le sujet, immédiatement après la crise ou la mort, renferme dans ses organes un taux de sulfocyanure pratiquement identique.

Le tableau même de l'espèce de résurrection à laquelle on assiste fait penser que le glutathion, qui n'intervient pas dans la transformation de cyanure en sulfocyanure, a une action directe et immédiate sur le phénomène physique d'asphyxie caractérisant l'intoxication cyanhydrique. Il déclencherait une sorte de respiration artificielle particulièrement puissante, provoquant une durée de survie suffisante pour l'élimination par la voie

pulmonaire du poison. Ce processus est parfaitement en accord avec ce que nous savons des propriétés oxydo-réductrices du glutathion. Le choc que paraît subir le sujet traité, et qui s'extériorise par de violents tremblements rappelant une crise tétanique, s'explique également par le phénomène bien établi de la rapidité du rétablissement dans l'organisme de l'équilibre entre la forme réduite et la forme oxydée lorsque l'on injecte du glutathion réduit.

Cette conclusion, à laquelle nous a amenée l'étude de l'intoxication cyanhydrique, nous paraît avoir une portée plus générale. En d'autres termes, il semble bien que le glutathion, dont l'action biologique est caractérisée par l'équilibre entre les formes réduite et oxydée ne peut provoquer d'effet physiologique qu'autant qu'il y a rupture de cet équilibre, celui-ci se rétablissant instantanément et nécessairement.

CHAPITRE IX



CONCLUSIONS

Lorsque nous avons voulu entreprendre ce travail, la première obligation qui s'est imposée à nous était d'avoir à notre disposition du glutathion à l'état pur. Nous avons essayé dans ce but diverses méthodes, mais nous avons dû successivement les abandonner, soit parce que les manipulations qu'elles nécessitaient étaient d'une longueur incompatible avec l'obtention d'un produit pur, soit parce que le rendement était trop faible. Nous avons donc mis au point une méthode, dont nous avons fait une étude approfondie de tous les stades, ce qui nous a permis d'avoir un produit très pur et un rendement supérieur à celui obtenu jusqu'alors.

Grâce à la possession de glutathion pur, cristallisé, nous avons pu contrôler les caractères physiques et chimiques qui lui avaient été attribués et vérifier que ce corps répondait à la formule d'un tripeptide de poids moléculaire égal à 307 : le glutamyl-cystéinyl-glycine.

Après avoir rappelé la théorie générale de l'oxydo-réduction, nous avons souligné le rôle de transporteur d'hydrogène et de tampon régulateur du rH^2 cellulaire du glutathion, ces propriétés en faisant un corps d'importance capitale pour la respiration tissulaire.

Ayant à notre disposition du glutathion pur, nous avons pu faire une étude critique des divers modes de

dosage et adopter ainsi, pour l'étude physiologique et toxicologique de ce composé, la méthode de Mme Randoin et René Fabre, qui nous a paru la plus satisfaisante.

Enfin, une partie importante de notre travail a été l'étude de l'action du glutathion dans l'intoxication par l'acide cyanhydrique. Il nous a fallu, tout d'abord, déterminer avec précision la dose toxique d'acide cyanhydrique pour le Cobaye, dose que nous avons trouvée inférieure à celle généralement admise par les auteurs.

Injectant à des Cobayes des quantités d'acide cyanhydrique supérieures à la dose mortelle, nous avons pu combattre efficacement les effets de l'intoxication par injection de glutathion. Ces résultats, d'une netteté et d'une constance remarquables, nous ont conduite à rechercher le mécanisme de l'action du glutathion.

Il nous a fallu, en premier lieu, voir si le glutathion n'agissait pas, comme certains auteurs le croyaient, en transformant le cyanure en sulfocyanure non toxique. A cet effet, nous avons effectué de nombreuses expériences sur le Cobaye. Nous avons recherché si l'intoxication cyanhydrique déterminait des variations du taux du glutathion. Puis, après avoir mis au point une méthode colorimétrique de dosage des cyanures et des sulfocyanures, sensible au 1/5.000 de milligramme, nous avons déterminé la quantité de ces principes, contenus dans les viscères, d'une part des Cobayes intoxiqués par l'acide cyanhydrique, d'autre part des Cobayes ayant résisté à l'intoxication, grâce à l'injection de glutathion.

Nous n'avons pas trouvé de différence dans le taux des sulfocyanures qui est identique dans les deux cas. Nous avons donc repoussé, comme mécanisme essentiel de l'action antidotique du glutathion, la formation de sulfocyanure. Mais il nous a semblé que nous étions en droit de formuler une hypothèse sur l'action du glutathion, hypothèse qui, pour nous, résumerait non seulement l'action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique, mais illustrerait toute sa biochimie.

Le glutathion, normalement présent dans les organismes, s'y trouve à l'état d'équilibre entre sa forme réduite

et sa forme oxydée; c'est d'une part l'étude des facteurs de modification de cet équilibre qui éclaire toute la physiologie des dérivés sulphydrylés. D'autre part, c'est en détruisant expérimentalement cet équilibre, qui nécessairement se rétablit, qu'on provoque chez l'animal une sorte de phénomène de choc, qui permet à l'organisme de lutter efficacement contre l'intoxication.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
TASSILY

Vu :
Le Doyen de la Faculté
Paul GUERIN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E.) und WERTHEIMER (E.). — Studien über Autoxydationen. II. Mitteilung. Versuche über die Umwandlung von Cystein in Cystin unter verschiedenen Bedingungen. (*Pflüger's Arch.*, 1923, **198**, 122-127.)
ABDERHALDEN (E.) und WERTHEIMER (E.). — *Archiv. Gesammt. Physiol.*, 1923, **198**, 169-178 et 1923, **199**, 352-364.
2. ABDERHALDEN (E.), BUADZE (S.) und GEIDEL (W.). — Untersuchungen über den Einfluss des glutathions auf die Autolyse und ferner den Eiweiss stoffwechsel. (*Fermentforsch.*, 1932, **13**, 147-155.)
3. ABELOUS (J.-E.) et ALOY (J.). — Sur l'existence d'une diastase oxydoréductrice chez les végétaux. (*C. R. Ac. Sc.*, 1904, **138**, 382.)
4. ACHARD (Ch.) et BINET (L.). — Les effets de l'hyposulfite de soude sur l'intoxication par le cyanure de potassium. (*C. R. Ac. Sc.*, 1934, **198**, 222.)
5. ACHARD (Ch.), Mlle Jeanne LÉVY et GUTHMANN (G.). — Contribution à l'étude de la glutathionémie à l'état normal et dans divers états pathologiques. (*Bull. Ac. Med.*, 1932, **107**, 566-580.)
6. ALLOT. — The influence of glutathione on the oxidation of fats and fatty acids. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 957.)
7. ANDREWS (J.-C.). — The optical activity of cystine. (*Journ. of biol. Chem.*, 1925, **65**, 147-159.)
8. ARNOLD (V.). — Eine Farbenreaktion von Eiweiskörpern mit nitroprussidnatrium. (*Zeit. physiol. chem.*, 1911, **70**, 300-309.)
9. ARNOLD (V.). — Über den cysteingehalt der tierischen organe. (*Zeit. physiol. chem.*, 1911, **70**, 314-325.)

10. ARNOVLJEVITCH (Mirko). — Rapport entre le taux du glutathion dans le sang et la glycémie chez le lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 1479.)
11. ARNOVLJEVITCH (Vojislav). — Augmentation du glutathion dans le foie et dans le sang, après administration d'hypo-sulfite de soude, par voie entérale. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 681.)
12. ARNOVLJEVITCH (Vojislav). — Le rapport entre le taux du glutathion sanguin et la glycémie chez l'homme normal et chez les diabétiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 1481.)
13. BACH (I.) und KÖRPASSY (B.). — Untersuchungen über den Katalase und Glutathiongehalt der roten Blutkörper bei experimentellen Anämien. (*Magyar Orvosi Archivum*, 1933, **34**, 44-50.)
14. BAUDISCH (O.) and DYER (E.). — The o-quinone test for cysteine. (*Journ. of biol. Chem.*, 1933, **99**, 485-492.)
15. BARRENSCHEEN (H.-K.) und BENESCHOVSKY (H.). — Die rolle der Sulfhydrylverbindungen im Kohlenhydrat Abbau. (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **255**, 453-463.)
16. BAUMANN (C.-T.) und DESCHWANDEN (J. VON). — Über Glutathion und bestrahlte Bierhese. (*Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, 1933, **54**, 281-302.)
17. BEDEL (Ch.). — Contribution à l'étude des produits de polymérisation de l'acide cyanhydrique. (*Th. Dipl. Pharm. sup.*, Paris, 1923.)
BEDEL (Ch.). — Sur la toxicité d'un polymère de HCN. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1924, **30**, 189-194.)
18. BEHRE (J.-A.) and BENEDICT (S.-R.). — The occurrence and determination of thioneine (ergothioneine) in human blood. (*Journ. Biol. Chem.*, 1929, **82**, 11-15.)
BENEDICT (S.-R.). — The analysis of whole blood. II. The determination of sugar and saccharoids (non fermentable copper-reducing substances). (*Journ. of biol. Chem.*, 1931, **92**, 141-159.)
19. BENEDICT (S.-R.) and GOTTSCHALL. — The determination of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1933, **99**, 729-740.)
20. BENEDICT (S.-R.) and NEWTON (E.-B.). — The use of molybdic acid as a precipitant for blood protein. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **82**, 5-10.)
21. BENEDICT (S.-R.) and NEWTON (E.-B.). — Studies on the non sugar reducing substances of the blood and urine. I. Glutathione and thioneine in blood. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 361.)

- 21 bis. BERGMANN und STATHER. — *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1926, **152**, 189.
22. BETHOUX (L.) et CARRAZ (G.). — La glutathionémie au cours de la tuberculose pulmonaire chronique. (*Bull. Acad. Med.*, 1933, **110**, 51 à 57.)
23. BIERICH (R.) und KALLE (K.). — Untersuchungen über das Zustandekommen der bösartigen Geschwülste. (*Ztschr. für physiol. Chem.*, 1926, **158**, 1-6.)
24. BIERICH und KALLE (K.). — Über die vorgänge bei der Sulfhydryltitration mit Jodstärke und nitroprussiadnatrium. (*Ztschr. für physiol. Chem.*, 1928, **175**, 115-134.)
BIERICH (R.) und KALLE (K.). — Untersuchungen über das Zustandekommen der bösartigen Geschwülste. (*Hoppe Seylers Zeit.*, 1926, **158**, 1-6.)
25. BIERICH (R.) und ROSENBOHM (A.). — Über das Glutathion der Gewebe. (*Ztschr. für physiol. Chem.*, 1933, **215**, 151-163.)
26. BIERICH (R.), ROSENBOHM (A.) und KALLE (K.). — Untersuchungen über das Zustandekommen der bösartigen Geschwülste. (*Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **164**, 207-216.)
27. BIN (F.-C.), ADAMS (W.-L.) and BOWMAN (R.-O.). — *J. Nutrit.*, 1932, **5**, 571-579.
28. BINET (L.). — Le glutathion. (*La Presse médicale*, 1928, 293.)
29. BINET (L.) et ARNAUDET (A.). — Glande surrénale et glutathion. (*La Médecine*, 1931, N° 13, 682-685.)
30. BINET (L.) et ARNAUDET (A.). — Variations quantitatives du glutathion réduit dans le foie suivant diverses conditions expérimentales. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 1117 et 1118.)
31. BINET (L.) et ARNAUDET (A.). — Recherches sur le taux du glutathion du sang au cours des affections hépatiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 24-26.)
32. BINET (L.), BLANCHETIÈRE (A.) et ARNAUDET (A.). — Synthèse du glutathion dans la glande surrénale. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 56.)
33. BINET (L.), CARDOT (H.) et WILLAMSON (R.). — Le rôle de la rate dans la détermination de la polyglobulie asphyxique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 262.)
34. BINET (L.) et GIROUD (A.). — Glandes surrénales et glutathion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 434.)

35. BINET (L.) et GLEY (P.). — Teneur en glutathion réduit des tissus du pigeon; action des glandes génitales. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1634.)
36. BINET (L.), VERNE (J.) et ARNAUDET (A.). — Les substances à groupement sulfhydryle dans la peau et dans le foie (variations provoquées). (*Soc. Méd. des Hôp. de Paris*, 1932, N° 6 (3^e série), 206-209.)
37. BINET (L.) et WELLER (G.). — Teneur des organes en glutathion réduit, au cours de l'hyperthermie provoquée. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 124.)
38. BINET (L.) et WELLER (G.). — Une nouvelle méthode du dosage du glutathion. (*C. R. Ac. Sc.*, 1934, **193**, 1185.)
39. BLANCHETIÈRE (A.). — Le soufre protéique, le glutathion et le philotion. (*Le Progrès Médical*, 1926, **46**, 1713.)
40. BLANCHETIÈRE (A.) et BINET (L.). — Sur la teneur en glutathion des divers organes du chien. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, **94**, 494.)
41. BLANCHETIÈRE (A.) et BINET (L.). — Sur les variations de la teneur en glutathion réduit des tissus du chien dans l'asphyxie et certaines intoxications. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1227.)
42. BLANCHETIÈRE (A.) et BINET (L.). — Influence du régime sur la teneur en glutathion réduit des tissus du Chien. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 558.)
- BLANCHETIÈRE (A.) et BINET (L.). — Teneur en glutathion réduit de quelques glandes du Chien. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 621.)
- BLANCHETIÈRE (A.) et BINET (L.). — La teneur en glutathion réduit des diverses variétés de muscles chez le Lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1098.)
43. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et ARNAUDET (A.). — Capsules surrénales et glutathion. (*Journal de Phys. et de Pathol. Génér.*, 1930, **28**, 816.)
44. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et ARNAUDET (A.). — Le glutathion du tissu surrénal au cours de la gravidité. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 163.)
45. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et MÉLON (L.). — Sur les relations entre la contraction et la teneur en glutathion réduit du muscle. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 537.)
46. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et MÉLON (L.). — Influence de la dépancréatisation sur la teneur en glutathion réduit des tissus du chien. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 623.)

47. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et MÉLON (L.). — Le glutathion réduit du sang. Ses relations avec la respiration pulmonaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 1049.)
48. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et MÉLON (L.). — Les catalyseurs thermostables. Les catalyseurs sulfurés et en particulier le glutathion. (*Journ. de Physiol. et de Pathol. Gén.*, 1929, **27**, 1-11.)
49. BLANCHETIÈRE (A.), BINET (L.) et MÉLON (L.). — Les catalyseurs thermostables. Les catalyseurs sulfurés et en particulier le glutathion. (*Journ. Physiol. et Pathol. Gén.*, 1929, **27**, 19-30.)
50. BLANCHETIÈRE (A.) et MÉLON (L.). — Sur le dosage du glutathion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 242-244.)
51. BLANCHETIÈRE (A.) et MÉLON (L.). — Sur la diffusion du glutathion dans le règne animal. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 123.)
52. BODANSKY and MEYER. — The conversion of cyanide into thiocyanate in man and in alkaline solution of cystine. (*Journ. Pharmacol. and Exp. Therap.*, 1929, **37** (4), 463, 474.)
53. BODANSKY (M.). — *Journ. Pharmacol.*, 1929, **37**, 463-474.
54. BÖDINE (J.-H.). — Some physiological actions of cyanides. (*Journ. Génér. Physiologie*, 1925, **7**, 19-23.)
55. BORCHARDT (H.) und PRINGSHEIM (H.). — Über die Aktivierung von Pankreasmylase durch Glutathion. (*Bioch. Ztschr.*, 1933, **259**, 134-137.)
56. BOUCHER-FIRLY (S.). — Le glutathion chez l'anguille et le congre. Les rapports avec les phénomènes respiratoires. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1291.)
57. BRAIER (B.) et MARENZIE (A.-D.). — Dosage colorimétrique du glutathion du sang et des tissus. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 319.)
58. BRAND and SANDBERG (M.). — The lability of the sulfur in cystine derivatives and its possible bearing on the constitution of insulin. (*Journ. of biol. Chem.*, 1926, **70**, 381-395.)
59. BROOKS (M.-M.). — The effect of methylene blue on HCN and CO poisoning. (*Am. Journ. Physiol.*, 1932, **102**, 144-147.)
60. BUFFA, cité d'après Hopkins. (*Biochem. Journ.*, 1921, **15**, 286-305.)

61. BUMM (E.) und APPEL (H.). — Über die Wirkung von Glutathion auf die Pasteursche Reaktion. (*Ztsch. für Physiol. Chem.*, 1932, **210**, 79-86.)
62. CAHANE (M.). — Augmentation du soufre du sang après administration d'insuline. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 644.)
63. CALLOW (A.-B.). — The oxygen uptake of bacteria. (*The Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 507-518.)
64. CALLOW (A.-B.) and ROBINSON (M.-E.). — The nitroprusside reaction of bacteria. (*The Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 19-24.)
65. CAMPANACCI (D.). — Kohlehydratstoffwechsel und lösliche Schwefel verbindungen in den Erythrocyten und Geweben. (*Klin. Woch.*, 1930, **9**, 1212-1213.)
66. CAMPBELL (D.) and GEILING (E.-M.-K.). — Labile sulfur in the blood. (*J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, 1926, **28**, 389-394.)
67. CANNAN (R.-K.) and KNIGHT (B.-C.-J.-G.). — Dissociation constants of cystine, cysteine, thioglycollic acid and α -thiolactic acid. (*Biochem. journ.*, 1927, **21**, 1384, 1390.)
68. CANNICCI (G.). — *Atti. Accad. Lincei*, 1930, **327**, 601-606.
69. CANNICCI (G.). — *Atti. Accad. Lincei*, 1930, **327**, 509-515.
70. CHANG (H.-C.) and LING (S.-M.). — The glutathione content of the stomach. (*Chinese J. Physiol.*, 1929, **3**, 341-352.)
CHANG (H.-C.) and LING (S.-M.). — The question of the existence of glutathione in the skin with some criticism on the modified method of Perlzweig and Dalrue. (*Chinese J. Physiol.*, 1930, **4**, 131-140.)
71. CHANTON (L.-R.). — Teneur en glutathion réduit du sang du coq et de la poule domestiques adultes normaux. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 556-558.)
72. CHANTON (L.-R.). — La teneur en glutathion réduit du sang du chapon. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 665.)
CHANTON (L.-R.). — La teneur en glutathion réduit du sang des coqs féminisés, des poules masculinisées et des intersexuées. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 757.)
73. CHANTON (L.-R.) et CARIDROIT (F.). — La glutathionémie chez les coqs et chez les poules Sebright. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 893.)
74. CHATAIN. — Métabolisme des corps azotés et des hydrates de carbone chez les néoplasiques. Glutathion du sang. (*Thèse doct. univers. Pharmacie Lyon*, 1930.)

75. CHEN (K.-K.), ROSE (C.-L.) and CLOWES (G.-H.). — *Journ. Am. Med. Ass.*, 1933, **100**, 1920-1922.
76. COHEN (B.). — *Ind. Engineer. Chem.*, 1933, **25**, 472.
77. COLLAZO (J.) und PI-SUNER-BAYO (C.). — Über die Wirkung der B-Vitamine und des Insulins auf die Kohlenhydrat-Stoffwechseltörungen bei Mangel an B-Vitaminen. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **238**, 335-350.)
78. CRUZ (A. da). — Sur la teneur en glutathion des testicules des cobayes thyroïdectomisés. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1588-1590.)
79. DAKIN (H.-D.). — The oxidation of amido-acids with the production of substances of biological importance. (*Journ. of. biol. Chem.*, 1905, **1**, 171-176.)
80. DAKIN (H.-D.). — Note on the oxidation of glutamic and aspartic acids by means of hydrogen peroxide. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1908-1909, **5**, 409-411.)
81. DAKIN (H.-D.). — Oxidations and reductions in the animal body. (*Longmans and Co*, Londres, 1922 (2^e éd.).
82. DAMAS (L.). — Le glutathion. (*Bull. Sc. Pharmacol.*, 1930, **37**, 501.)
83. DANIEL and DORAN. — Some chemical constituents of the mussel. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 676-684.)
84. DELAVILLE (M.) et KOWARSKI (L.). — Remarques sur le dosage du glutathion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 1220.)
85. DELAVILLE (L.) et KOWARSKI (L.). — Etude de l'indice d'iode du sang. I. L'absorption d'iode par le sang et la notion de l'indice d'iode. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 660.)
86. DELORE (P.). — Sur la teneur en glutathion réduit de divers organes du Cobaye tuberculeux. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 974.)
87. DELORE (P.). — Recherches sur la teneur en glutathion réduit des tissus animaux au cours de la tuberculose et de diverses intoxications. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 1071.)
88. DELRUE (G.) et VISCHER (A.). — Modifications du taux du glutathion sanguin, durant le séjour à haute altitude. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 942.)
89. DESGREZ (A.). — Influence de la constitution chimique sur la toxicité des nitriles et des amides. (*C. R. Ac. Sc.*, 1912, **153**, 895-897.)

90. DICKENS. — Iodacetic acid, Glutathione and Tissue Glyoxalase. (*Nature*, 1933, **131**, 130.)
91. DIXON (M.). — On the mechanism of oxidation-reduction potential. (*Proc. of the Roy. Soc. (ser. B)*, 1927, **101**, 57-70.)
92. DIXON (M.). — The action of carbon monoxide on the autoxidation of sulphhydryl compounds. (*Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 902-908.)
93. DIXON (M.) and QUASTEL (J.H.). — A new type of reduction-oxidation system. (*Chem. Soc.*, 1923, **123**, 2943.)
94. DIXON (M.) and MELDRUM (N.V.). — A crystalline tripeptid from living cells. (*Nature*, 1929.)
95. DIXON (M.) and TUNNICLIFFE (H.E.). — The oxidation of reduced glutathione and other sulphhydryl compounds. (*Proc. of the Roy. Soc. (ser. B)*, 1923, **94**, 266-297.)
96. DIXON (M.) and TUNNICLIFFE (H.E.). — On the reducing power of glutathione and cystein. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 844-851.)
97. DOBROWOLSKA (S.). — Oxydation de l'acide urique sous l'influence d'accepteurs d'hydrogène. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1022.)
98. DUFOURT (A.) et PERROT. — Dosage du glutathion sanguin chez les tuberculeux pulmonaires. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 790.)
99. DYER (E.) and BAUDISCH (O.). — A new color test for cystein. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1932, **95**, 483-489.)
100. ELLIOT (K.-A.-C.). — On the catalysis of the oxidation of cysteine and thioglycollic acid by iron and copper. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 310-326.)
101. ELVEHJEM (C.-A.). — Factors affecting the catalytic action of copper in the oxidation of cysteine. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 415-426.)
102. EVERETT (M.-R.). — Total sugar of blood and urine. — III. The reducing action of glutathione. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **87**, 761-766.)
103. FABRE (R.). — Le glutathion. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1927 (8), **5**, 219-245.)
104. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude physiologique du glutathion par la méthode des perfusions. (*C. R. Ac. Sc.*, 1927, **185**, 1528.)

105. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude physiologique du glutathion par la méthode des perfusions. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1928, **7**, 447.)
106. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude du pouvoir oxydo-réducteur des tissus. (*C. R. Ac. Sc.*, 1930, **190**, 1233.)
107. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. Recherches sur la levure de bière. Influence de la dessiccation. (*C. R. Ac. Sc.*, 1930, **191**, 1075.)
108. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude du pouvoir oxydo-réducteur des tissus. — II. Recherches sur le foie perfusé. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1930 (8), **12**, 193-213.)
109. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude du pouvoir oxydo-réducteur des tissus. — III. Recherches sur la pulpe de foie. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1930 (8), **12**, 253.)
110. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. — IV. Recherches sur la levure de bière. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 923-942.)
111. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. — IV. Recherches sur la levure de bière. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1931, **14**, 418.)
112. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. — IV. Recherches sur la levure de bière (suite et fin). (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1931, **14**, 465.)
113. FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Recherches sur la levure de bière. Conditions expérimentales de son action sur la cystine. (*C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 852.)
114. FAURE-FRÉMIET (E.) et DRAGOIU (J.). — Caractérisation microchimique d'un composé sulfuré dans la cellule épithéliale granuleuse du poumon. (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 304.)
115. FEIGL (F.). — *Ztschr. Anal. Chem.*, 1928, **74**, 369.
116. FINK (D.-E.). — *Science*, 1927, **65**, 143.
117. FIRKET (J.). — *C. R. III^e conférence internationale Leeuwenhoek-Vereeniging*, 1930, p. 108.
118. FIRKET (J.) et COMHAIRE. — *Bull. Ac. Roy. Med.*, 1929, p. 93-122.

119. FLATOW (L.). — Uber ferricyanometrische Mikromethoden in der Blutanalyse. (*Biochem. Ztschr.*, 1928, **194**, 132-139.)
120. FLEISCH (A.). — Some oxidation processes of normal and cancer tissue. (*Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 294-311.)
121. FLEMING (R.). — A sensitive reaction for cysteine. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 965.)
122. FLEMING (R.). — Modification de la réaction au nitroprussiate de soude pour les dérivés sulphydrylés à faible concentration. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 831.)
FLEMING (R.). — Dosage du glutathion par une méthode colorimétrique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 259.)
123. FLEMING (R.). — The glutathione content of anti anaemic substances used in the treatment of pernicious anaemia. (*Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 461-463.)
124. FLURIN (H.). — Le métabolisme du soufre. (*Progrès médical*, 1926, N° 46.)
125. FOLIN (O.). — A system of blood analysis. (*Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 377-391.)
126. FOLIN (O.). — A new blood sugar method. (*Journ. of biol. Chem.*, 1928, **77**, 421-430.)
127. FOLIN (O.) and LOONEY (J.-M.). — Colorimetric method, for the separate determination of tyrosine, tryptophane and cystine in proteins. (*Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 421-434.)
128. FOLIN (O.) and MARENZI. — An improved colorimetric method for the determination of cystine in proteins. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 103-108.)
129. FOLIN (O.) and WU (H.). — A system of blood analysis. (*Journ. of biol. Chem.*, 1919, **38**, 81-110.)
130. FORNIELES and ULIBARI. — *Arch. exp. oncol.*, 1930, **1**, 349.
131. GABBE (E.). — *Klin. Woch.*, 1929, **8**, 2077.
132. GABBE (E.). — Uber den Glutathiongehalt der Organe, insbesondere der Muskeln. (*Klin. Woch.*, 1930, **9**, 169-170.)
133. GALLET (T.). — Contribution à l'étude des variations du taux du glutathion dans le sang et dans les tissus sous certaines influences chimiothérapiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 688-690.)
134. GAUTIER. — La chimie de la cellule vivante. (Paris, *Gauthier-Villars*, 1898.)

135. GARRELON (A.) et GALLET (T.). — Variations du taux du glutathion dans le sang sous l'influence d'injections de vagotonine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 1195.)
136. GAVRILESCU (N.). — The iodine method for the determination of glutathione. (*Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1190-1194.)
137. GIROUD (A.). — Protoplasma et glutathion. (*C. R. Soc. de Biol.*, 1928, **98**, 376.)
138. GIROUD (A.). — Les substances à fonction sulfhydryle du protoplasma. (*Protoplasma*, **12**, N° 1, 1931.)
139. GIROUD (A.). — Sur les substances à fonction sulfhydryle des tissus. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 141-142.)
140. GIROUD (A.) et BULLIARD (H.). — La kératinisation de l'épiderme et des phanères. Genèse des substances soufrées de la kératine. (*Arch. Morphol. gén. et Expér.*, 1930, **29**.)
141. GIROUD (A.) et BULLIARD (H.) — Sur les substances à fonction sulfhydryle de l'épiderme. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 138-140.)
142. GIROUD (A.) et BULLIARD (H.). — Sur une réaction des substances à fonction sulfhydryle. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 278-279.)
143. GIROUD (A.), BULLIARD (H.) et GIBERTON (A.). — Y a-t-il une accumulation élective de soufre précédant la kératinisation? (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 1024.)
144. GOLA (G.). — *Malpighia*, 1903, **16**, 368.
145. GRASSMANN (W.-W.), DYCKERHOFF (H.) und HEIBELER (H.). — Über die enzymatische Spaltung des Glutathions. (*Zeit. f. physiol. Chem.*, 1930, **189**, 112-120.)
146. GULLAND (J.-M.) and PETERS (R.-A.). — Observations upon the reducing substances of pigeon's blood. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 91-103.)
147. GWEN (J.) and MEYER (J.-W.). — The influence of glutathione on reduction and rotation of blood filtrates. (*Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 624-632.)
148. HANDOVSKY (H.). — Some observations on the oxidation of phenols by tissues and on the significance of surfaces for biological oxidations. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 1114-1124.)

149. HANDOVSKY (H.), CASIER (H.) et SCHIPENS (Ch.). — Nouvelles recherches concernant le mécanisme de la stimulation du métabolisme, provoqué par les dinitrodérivés (dinitrocyclopantylphénol). (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1727.)
150. HARDING (T.-S.) and CARK (C.-A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1926, **23**, 319.)
151. HABS (H.). — Glutathione in exercised muscles. (*Klin. Woch.*, 1929, **8**, 2187-2188.)
152. HARRIS (L.-J.). — On the denaturation of proteins. (*Proc. Roy. Soc.*, 1923, **94**, 438.)
153. HARRIS (L.-J.). — The titration of Amino-and Carbovyl-Groups in Amino-Acids Polypeptides, etc. (*Proc. Roy. Soc. (série B)*, 1923-24, **95**, 440-484.)
154. HARRIS (L.-J.). — Use of the quinhydrone electrode for the estimation of amino-acids and of acid and basic functions. (*Journ. Chem. Soc.*, 1923, **123**, 3294-3303.)
155. HARRIS (L.-J.). — The combination of Proteins, Amino-Acids, with Acids and Alkalis. (*Proc. Roy. Soc. (série B)*, 1929, **104**, 412.)
156. HARRIS (L.-J.). — Determination of Amino and Carboxyl Groups and of the Minimal Molecular Weight, by the Acidimetric Titration Technique. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 296-309.)
157. HARRISON (D.-C.). — The catalytic action of traces of iron on the oxidation of cysteine and glutathione. (*Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 1009.)
158. HARRISON (D.-C.). — The catalytic action of traces of iron and copper on the anaerobic oxidation of sulphydryl compounds. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 335.)
159. HARRISON (D.-C.). — The autocatalytic oxidation of sulphydryl compounds. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1405-1415.)
160. HARRISON (D.-C.) and THURLOW (L.). — The secondary oxidation of some substances of physiological interest. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 217.)
161. HEFFTER (A.). — *Berträge Chem. Physiol. und Path.*, 1904, **5**, 213.)
162. HEFFTER (A.). — Die reduzierenden Bestandteile der Zelle. (*Med. Naturwissenschaft Arch.*, 1908, **1**, 81.)

163. HELE (T.-S.) and PIRIE (N.-W.). — Studies in the sulphur metabolism of the dog. VIII. The metabolism of glutathione compared with that of other cystine derivatives. (*Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1095-1101.)
164. HERBERT (F.-K.) and BOURNE (M.-C.). — The non-sugar reducing substances of human blood, with special reference to glutathione. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 299-309.)
165. HERBERT (F.-K.), BOURNE (M.-C.) and GRÆN (J.). — The effect of glutathione on the determination of blood-sugar. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 291.)
166. HESS (W.-C.). — The determination of glutathione with special reference to human blood. (*Journ. Wash. Ac. Sc.*, 1929, **19**, 419-425.)
167. HESS (W.-C.) and SULLIVAN (M.-X.). — The o-benzoquinone test for cysteine. (*Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, 95-97.)
168. HEYMANS (C.) et SOENEN (R.). — Le glucose n'empêche pas l'empoisonnement par les composés du cyanogène. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 202.)
169. HIRANO (Y.). — *Orient J. Diseases Infants*, 1933, **13**, 6.
170. HIRSCH (H.). — *Strahlentherapie*, 1927, **26**, 279.
171. HIRSCH (R.). — Recherches sur les mécanismes généraux de la croissance et sur ceux des croissances néoplasiques. (*Bull. Ac. Méd.*, 1930, **104**, 539-548.)
172. HOFFMAN (W.-F.) and GORTNER (R.-A.). — Determination of sulfur in organic compounds. (*Journ. Am. Chem. Soc.*, 1923, **45**, 1033-1036.)
173. HOLDEN (H.-F.). — Experiments on respiration and fermentation. (*Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 534-542.)
174. HOLDEN (H.-F.). — A note on the presence of glutathione in the corpuscles of mammalian blood. (*Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 727-728.)
175. HOLMES (B.-E.). — Oxidative mechanism of tumor tissue. The anaerobic habit of tumor. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 812-815.)
176. HOPKINS (F.-G.) and DIXON (M.-J.). — On glutathione. II. A thermostable oxidation-reduction system. (*Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 527-563.)
177. HOPKINS (F.-G.). — Some oxidative mechanisms of the cell. (*Bull. of Johns Hopkins Hospital*, 1921, **32**, 321-328.)

178. HOPKINS (F.-G.). — On an autoxidisable constituent of the cell. (*Biochem. Journ.*, 1921, **15**, 286-305.)
180. HOPKINS (F.-G.). — An oxidative mechanism in the living cell. (*Lancet*, 1923, **1**, 1251.)
181. HOPKINS (F.-G.). — Glutathione — its influence in the oxidation of fats and proteins. (*Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 787-819.)
182. HOPKINS (F.-G.). — On current views concerning the mechanism of biological oxidation. (*Skand Arch.*, 1926, **49**, 33.)
183. HOPKINS (F.-G.). — On the isolation of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 185.)
184. HOPKINS (F.-G.). — On glutathione : a reinvestigation. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 269-320.)
185. HOUSSAY (B.-A.) et MAZZOCCO (P.). — Le glutathion et les propriétés réductrices des tissus des Rats décapsulés. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 417.)
186. HUG (E.). — L'intoxication par l'acide cyanhydrique, action antidote de l'hyposulfite de sodium. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 87.)
187. HUGHES (W.-S.). — *Journ. Chem. Soc.*, 1928, 491.
188. HUNTER (G.). — A new test for ergothioneine upon which is based a method for its estimation in simple solution and in Blood filtrates. (*Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 4-10.)
189. HUNTER (G.) and EAGLES (B.-A.). — Non-protein sulfur compounds of blood. II. Glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 133-146.)
190. HUNTER (G.) and EAGLES (B.-A.). — Glutathione. A critical study. (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 147-166.)
191. HUNTER (G.) and EAGLES (B.-A.). — On the presence of cystine in liver. (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 167-175.)
192. HUNTER (G.) and EAGLES (B.-A.). — The colorimetric estimation of cystine and glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 177-183.)
193. JOHNSON (J.-M.) and VÖGTLIN (C.). — On the preparation and properties of pure glutathione (glutaminy-cysteine). (*Journ. of biol. Chem.*, 1927, **75**, 703-713.)
194. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Les caractères cytoplasmiques de la sexualité dans les Grégarines. (*C. R. Ac. Sc.*, 1924, **179**, 1212.)

195. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur l'évolution des lipoïdes et de la sexualisation du cytoplasme dans les Sporozoaires. (*C. R. Ac. Sc.*, 1925, **180**, 1074.)
196. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les différences de potentiels d'oxydation-réduction dans les spores d'une prêle. (*C. R. Ac. Sc.*, 1926, **182**, 980.)
197. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur la coloration vitale au rouge neutre des éléments de Golgi des Grégarines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 830.)
198. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur la comparaison entre les valeurs relatives des potentiels d'oxydo-réduction (rH) du pollen et de l'ovule chez quelques phanérogames. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1113.)
199. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur la signification de la valeur relative du rH dans la germination du pollen. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1184.)
200. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Les colorations vitales des Grégarines et les caractères de sexualisation du cytoplasme. (*C. R. Ac. Sc.*, 1926, **182**, 1295.)
201. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — L'hétérogamie des spores de prêles et les caractères de sexualisation du cytoplasme. (*C. R. Ac. Sc.*, 1926, **182**, 1555.)
202. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Caractères physico-chimiques de la sexualité. (*Rev. Gén. Sc. P. et App.*, 1927, **38**, 141-143.)
203. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — La teneur en glutathion réduit est un caractère de sexualisation du cytoplasme. (*C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 1088.)
204. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les rapports entre le glutathion et le chondriome. (*C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 1587.)
205. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les caractères physico-chimiques de la sexualité dans les spores de *Equisetum maximum*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 1217.)
206. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les rapports entre le glutathion et le potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 140.)
207. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur le rôle du chondriome dans le métabolisme cellulaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 327.)
208. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les rapports entre le nucléol, le chondriome et le glutathion. (*Protoplasma*, 1928, **4**, 174.)

209. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur les rapports entre le nucléol, le chondriome et le glutathion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 567.)
210. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — La recherche qualitative du glutathion. (*Bull. Histologie*, 1928, **5**, 331.)
211. JOYET-LAVERGNE (Ph.). — Sur quelques procédés de recherche microscopique du glutathion dans les cellules. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 658.)
212. JUNG (Ch.) et ZIMMET (D.). — *C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève*, 1932, **49**, 114.
213. JURA (V.). — *Policlinico*, 1930, **37**, 371.
214. KAYE (Madge). — Observations on the behaviour of a substance giving the nitroprusside reaction in skin and in hair. (*Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 1289-1293.)
215. KEESER (E.). — Über die biologische Wirksamkeit verschiedener Lichtarten. (*Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1932, **166**, 624-633.)
216. KEESER (E.). — Morphin und Fermente. (*Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1932, **167**, 267-284.)
217. KEILIN. — Cytochrome and Intracellular oxidase. (*Proc. of the Roy. Soc.*, 1930, **106**, 418-444.)
218. KENDALL (E.-C.). — The oxidizing and reducing power of cysteine and glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1928, **78**, XL.)
219. KENDALL (E.-C.), Mac KENZIE (B.-F.) and MASON (H.-L.). — A study of glutathione. I. Its preparation in crystalline form and its identification. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 657-674.)
220. KENDALL (E.-C.), MASON (H.-L.) and Mac KENZIE (B.-F.). — Crystalline glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1930, **87**, XLI.)
221. KENDALL (E.-C.), MASON (H.-L.) and Mac KENZIE (B.-F.). — A study of glutathione. III. The structure of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1930, **87**, 55.)
222. KENDALL (E.-C.), MASON (H.-L.) and Mac KENZIE (B.-F.). — A study of glutathione. IV. Determination of the structure of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1930, **88**, 409-423.)
223. KENDALL (E.-C.) and NORD (F.-F.). — Reversible oxidation-reduction of cysteine-cystine and reduced and oxidized glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1926, **69**, 295-337.)

224. KENNAWAY (E.-I.) and HIEGER (I.). — Quantitative studies of the nitroprusside reaction in normal tissues and tumours. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 751-759.)
225. KERRIDGE (P.-M.-T.). — *Journ. Sc. Instruments*, 1926, **3**, 404.)
226. KING (E.), BAUMGARTNER (L.) und PAGE (I.-H.). — Glutathiongehalt des Blutes von Geisteskranken. (*Biochem. Ztschr.*, 1930, **217**, 389-394.)
227. KING (E.-J.) und LUCAS (C.-C.). — Eine Bemerkung zur jodometrischen Titration des glutathions. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **235**, 66-69.)
228. KISCH (B.). — Der Gehalt des Blutes einiger Wirbelloser an reduzierenden Substanzen. (*Biochem. Ztschr.*, 1929, **211**, 292-294.)
229. KITAMURA (K.). — Studien über Glutathion. (*Mitt. d. Med. Ak. Kioto*, 1929, **3**, 153-195.)
230. KOZLOWSKI (A.). — On the non-protein cysteine in plants. Preliminary note on the attempted isolation of glutathione from the pea (*pisum sativum*). (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 1346.)
231. KOZLOWSKY (A.). — Eine Kupferverbindung des oxydierten glutathions der Hefe. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **241**, 403-406.)
- KOZLOWSKI (A.). — Glutathione (?) der Erbse. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **241**, 407-408.)
232. KOZLOWSKI (A.). — Eine Kristallisierte Kupferverbindung des oxydierten Hefeglutathions. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **242**, 249-250.)
233. KSHITISH CHANDRA SEN. — *Indian J. Med. Res.*, 1933, **20**, 1051-1061.
234. KÜHNAU (J.). — Mikrobestimmung des reduzierten und des Gesamtglutathions der Leber. (*Biochem. Zeitschr.*, 1931, **230**, 353-372.)
235. LABBÉ et NEPVEUX (F.). — Les composés sulfhydrylés du sang à l'état normal et dans les états pathologiques. (*C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 1061.)
236. LABBÉ (M.), NEPVEUX (F.) et GRINGOIRE (J.-D.). — Influence des vitamines B sur la teneur en glycogène et en glutathion du foie des lapins. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 152.)

237. LACLAU (N.-C.) et MARENZI (A.-D.). — Pouvoir réducteur des tissus et régime pauvre en cystine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1287.)
238. LANG (S.). — Studien über Entgiftungstherapie. (*Arch. Exp. Path. Pharm.*, 1895, **36**, 75-77.)
239. LAVIALLE et VARENNE. — Note sur la caractérisation de l'acide cyanhydrique en toxicologie par la réaction du sulfocyanate ferrique. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1915, **12**, 74-81.)
240. LAVIALLE et VARENNE. — Caractérisation et dosage des petites quantités d'acide cyanhydrique. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1918, **17**, 97-102.)
241. LECLoux. — A propos des cellules cadmiophiles du poumon. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 1091.)
242. LECLoux (J.), VIVARIO (R.) et FIRKET (J.). — Teneur en glutathion du sarcome et des tissus normaux. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 1823.)
243. LEMELAND (H.-J.) et DELÉTANG (R.). — Glutathion et accouchement. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1518.)
244. LEMELAND (H.-J.) et DELÉTANG (R.). — Teneur en glutathion réduit des principaux organes du fœtus humain. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1630.)
245. LEMELAND (H.-J.) et DELÉTANG (R.). — Glutathionémie et avortement. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 381.)
246. LEMELAND (H.-J.) et DELÉTANG (R.). — Teneur en glutathion réduit de l'utérus gravide. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 383.)
247. Mac LEOD (J.-W.) and GORDON (J.). — The production of organic compounds of sulphur in bacterial cultures with special reference to glutathione. (*Biochem. Journ.*, 1934, **18**, 937.)
248. LÉOLIRA (J.-D.). — Sur le contenu en glutathion du placenta humain et des muscles gastrocnémiens éternés de Crapaud. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 469.)
249. LESURE (A.). — Dosage du soufre dans les tissus et les liquides de l'organisme. (*Progrès Médical*, 1926, n° **46**.)
250. LESURE (A.) et DUNEZ (A.). — Dosage du soufre dans le sang et les produits organiques. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 879.)
251. LEVADITI (C.) et HOWARD (A.). — Activation des propriétés curatives du bismuth dans la syphilis sous l'influence de tissus riches en glutathion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 469.)

252. LEVÈNE (P.-A.) and VAN SLYKE (D.-D.). — The composition and properties of glycocoll picrate and the separation of glycocoll from alanine. (*Journ. Biol. Chem.*, 1912, **12**, 285-294.)
253. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.) et COSMULESCO (I.). — Glutathion intra-globulaire et variations de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (variations de la courbe de dissociation). (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 1190.)
254. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.) et COSMULESCO (I.). — Influence de la pression en CO₂ (acidification du milieu) sur le pourcentage en glutathion réduit de sang total. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 345.)
255. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.) et COSMULESCO (I.). — Courbe de dissociation du glutathion réduit du sang total. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 343.)
256. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.), COSMULESCO (I.) et COMANESCO (V.). — Courbe de dissociation d'une solution de glutathion (forme réduite dans du sérum sanguin). (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 348.)
257. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.), COSMULESCO (I.) et COMANESCO (V.). — L'influence du glutathion sur la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine.
- Recherches sur le mécanisme de l'action du glutathion sur la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine.
(*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 779 et 781.)
258. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.), COSMULESCO (I.) et NESTORESCO (B.). — Sur un facteur tissulaire (glutathion) qui pourrait influencer la tension en oxygène du sang veineux chez les lapins normaux ou anémiés par saignées. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **106**, 110.)
259. LITARCZEK (G.), AUBERT (H.) et NESTORESCO (B.). — Le glutathion intrahématique chez les hyperthyroïdiens. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 82.)
260. LITARCZEK (G.) et DINISCHIOTU (G.-T.). — Sur les modifications spectroscopiques de l'hémoglobine dans l'anémie expérimentale du lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1011.)
261. LITARCZEK (G.) et DINISCHIOTU (G.-T.). — Glutathion et modifications du spectre de l'hémoglobine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1014.)
262. LITARCZEK (G.) et DINISCHIOTU (G.-T.). — Sur les variations spectrales de l'hémoglobine humaine, en relation avec le glutathion, chez le sujet normal et les anémiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 1252.)

263. LITARCZEK (G.) et DINISCHIOTU (G.-T.). — Conception sur la structure et la fonction oxydo-réductrice de l'hémoglobine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 285.)
264. LITARCZEK (G.) et DINISCHIOTU (G.-T.). — Sur la pénétrabilité du glutathion à l'intérieur de l'hématie. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 285.)
265. LITARCZEK (G.), DINISCHIOTU (G.-T.) et COSMULESCO (I.). — Sur l'influence des constituants du glutathion sur une certaine propriété spectrale de l'hémoglobine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 678.)
266. LITARCZEK (G.), DINISCHIOTU (G.-T.) et LITARCZEK (S.). — Sur la relation existant entre une certaine propriété spectroscopique de l'hémoglobine et le glutathion intrahématique chez diverses espèces animales. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 1255.)
267. LITARCZEK (G.), DINISCHIOTU (G.) et NESTORESCO (B.). — Sur les variations du pourcentage en glutathion réduit dans divers états anémiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 198.)
268. LITARZEK (G.), TOMESCO (M.) et NESTORESCO (B.). — Méthode de dosage dans le sang du glutathion total sous forme réduite. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 1310.)
269. LÆFFLER (E.) et RIGLER (R.). — *Centr. Parasit. Bakt.*, 1927, **104**, 265-266.
270. LÆPER (M.). — La thiémie normale et pathologique. (*Progrès médical*, 1926, n° **46**.)
271. LÆPER (M.), DECOURT et GARCIN (R.). — La fonction soufrée de la surrénale. (*Presse Médicale*, 1926, 1209.)
272. LÆPER (M.), DECOURT (J.) et GARCIN (R.). — La fonction thiopexique et thio-oxydante du foie. (*Presse Médicale*, 1927, 321.)
273. LÆPER (M.), DECOURT (J.) et LESURE (A.). — L'accumulation du soufre dans la peau après surrénalectomie. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1098.)
274. LÆPER (M.), DECOURT (J.), GARCIN (R.). — Les déchets soufrés de l'hémolyse. (*Presse Médicale*, 1928, 1313.)
275. LÆPER (M.), DECOURT (J.) et TONNET (I.). — Augmentation notable de la thiémie après surrénalectomie. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 332.)
276. LÆPER (M.), GARCIN (R.) et LESURE (A.). — Sur la fonction thiopexique et thio-oxydante du foie. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1467.)

277. LÆPER (M.), GARCIN (R.) et LESURE (A.). — La fonction thiopepxique de la surrénale. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 620.)
278. LÆPER (M.), GARCIN (R.) et LESURE (A.). — Accroissement de la charge soufrée de la capsule surrénale par injection de soufre, de sang et d'albumines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 1107.)
279. LÆPER (M.), LESURE (A.) et TONNET (J.). — Soufre et pigment surrénal. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 740.)
280. LÆPER (M.), LESURE (A.) et SÈZE (J. DE). — Variations régionales du soufre du cœur. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 322.)
281. LÆPER (M.), LESURE (A.) et TONNET (J.). — Le métabolisme soufré dans les processus articulaires chroniques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 31.)
282. LÆPER (M.), OLIVIER et TONNET (J.). — Le taux du soufre total et du soufre neutre dans le sérum des mélanodermiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 95.)
283. LOHMANN (K.). — Beitrag zur enzymatischen Umwandlung von synthetischen Methyl glyoxal in Milchsäure. (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **254**, 332-354.)
284. LURIE (D.-M.). — On the storage of sulphur in the adrenal glands. (*Endocrinology*, 1928, **12**, 84.)
285. MALKIN (S.-J.). — Glutathiongehalt bei Kreislaufkranken. (*Ztschr. Ges. exp. Med.*, 1933, **89**, 193-199.)
286. MALOWAM (S.-L.). — Einfluss der lufverdünnung auf den Glutathiongehalt der Lerber. (*Biochem. Ztschr.*, 1933, **257**, 437-441.)
287. MANN (P.-J.-G.). — The reduction of glutathione by a liver system. (*Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 785-790.)
288. MARENZI (A.-O.). — Micro-méthode permettant de déterminer la cystine des protéines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 405.)
288. MARENZI (A.-D.). — Micro-méthode permettant de déterminer les muscles de Crapauds hypophysoprives. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 394.)
290. MARENZI (A.-D.) et BRAIER (B.). — Régime déficient en cystine et glutathion des tissus. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 337.)
291. MASON (H.-L.). — A study of glutathione. II. The determination of reduced glutathione in tissues. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **86**, 623-634.)

292. MASON (H.-L.). — A study of glutathione. V. The spontaneous cleavage of glutathione in aqueous solution. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1931, **90**, 25-32.)
- MASON (H.-L.). — A study of glutathione. VI. The preparation of oxidized glutathione. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1931, **90**, 409-416.)
- MASON (H.-L.). — A method for the determination of oxidized glutathione preliminary experiments on the relation between oxidized and reduced glutathione. (*Proc. Staff. Meetings mayo clinic.*, 1931, **6**, 168-169.)
293. MATHEWS (A.-P.) and WALKER (S.). — The spontaneous oxidation of cystein. (*Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 21-28.)
- MATHEWS (A.-P.) and WALKER (S.). — The action of cyanides and nitriles on the spontaneous oxidation of cystein. (*Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 29-37.)
- MATHEWS (A.-P.) and WALKER (S.). — The spontaneous oxidation of cystin and the action of iron and cyanides upon it. (*Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 289-298.)
- MATHEWS (A.-P.) and WALKER (S.). — The action of metals and strong salt solutions on the spontaneous oxidation of cystein. (*Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 299-312.)
294. MATTEI (P.). — *Biochem. Terap. speriment.*, 1928, **15**, 366.)
295. MAUTHNER (J.). — Uber cystin. (*Zeit. Physiol. Chem.*, 1912, **78**, 28-36.)
296. MAVEROFF DE LISSNER (H.). — Hypophyse et glutathion sanguin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 726.)
297. MELBRUM (L.-U.). — The reduction of glutathion in mammalian erythrocytes. (*Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 817-828.)
298. MELDRUN (L.-U.) and DIXON (M.). — The properties of pure glutathione. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 472-496.)
299. MÉLON (L.). — Influence d'une alimentation riche en cystine sur le glutathion des tissus. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 1166.)
300. MEYERHOF (O.). — Untersuchungen zur Atmung getöteter Zellen. II. Mittel. Der Oxydations vorgang in getöteter Hefe und Hefe extrakt. (*Pflüger's Arch.*, 1918, **170**, 367-427.)
301. MEYERHOF (O.). — Untersuchungen zur Atmung getöteter Zellen. III. Mitteil. Die Admungserregung in gewaschener Acetonhefe und dem ultrafiltrationsrückstand von hefe-mazerationsaft. (*Pflüger's Arch.*, 1918, **170**, 428-475.)

302. MEYERHOF (O.). — Ueber ein neues autoxydables System der Zelle. Die Rolle der Sulfhydrylgruppe als Sauerstoffüberträger. (*Pflüger's Arch.*, 1923, **199**, 531-566.)
303. MEYERHOF (O.). — Chemical dynamics of life phenomena. (*Philadelphia and London Lippincott C°*, 1924.)
304. MICHAELIS (L.). — Oxidation-reduction systems of biological significance. VI. The mechanism of the catalytic effect of iron on the oxidation of cysteine. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 777-787.)
305. MICHAUX (M.), MOLLARET (P.) et TONNET (J.). — Les albumines et le glutathion réduit du sang, après injection d'huile soufrée. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 516.)
307. MONCORPS (C.) und SCHMID (R.). — Zur methodik des glutathionnachweises in Blut und Gewebe. (*Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1932, **205**, 141-153.)
308. MONCORPS (C.), BOHNSTEDT (R.-M.) und SCHMID (R.). — Über den Zucker und Glutathiongehalt von Blut und Haut bei Höhensonnen und Crotonöldermitis ein Beitrag zur Frage peripherisch bedingter Stoffwechselvorgänge. (*Arch. Dermatologie Syphilis*, 1933, **169**, 67-76.)
309. MORAES (A.) et CASIER (H.). — Hyperthermie par le dinitro- α -naphtol-sodique et teneur en glutathion réduit du muscle du foie et du sang chez le pigeon. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 577.)
310. MOREL (A.) et DELORE (P.). — Autoxydation du glutathion réduit dans les organes cadavériques et son inhibition par frigorification. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 975.)
311. MOREL (A.), GATE (J.) et DORCHE (J.). — Variations du taux du glutathion sanguin dans l'eczéma et le psoriasis. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 899.)
312. MOUREU (Ch.) et DUFRAISSE (Ch.). — Considérations sur l'autoxydation et les phénomènes catalytiques qui s'y rattachent. (*Deuxième Congrès de Chimie*, 1925, 524-)
313. MULLER (F.). — Die Bedeutung von leicht oxydablen chemischen Gruppen für die Pathologie des Stoffwechsels. (*Klin. Woch.*, 1933, **12**, 474-475.)
314. MURRAY (H.-A. Jr.). — The iodine reaction for the quantitative determination of glutathione in the tissues as a function of age. (*Journ. of gen. Physiol.*, 1925-26, **9**, 621-624.)
315. NICOLET (B.-H.). — The structure of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1930, **88**, 389-393.)

316. NITZULESCU (J.) et ORNSTEIN (I.). — La glutathionémie chez les vieillards. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 1134.)
317. OKUDA (Y.). — New methods for the determination of cystine. (*Journ. Biochem. Japan*, 1925, **5**, 201-215.)
- OKUDA (Y.). — A new method for the determination of cystine in protein (the iodine method). (*Journ. Biochem. Japan*, 1925, **5**, 217-227.)
318. OLIVIER (H.-R.). — Etude sur la fonction respiratoire au cours de la tuberculose pulmonaire. (*Th. Doct. Méd. Paris*, 1928.)
319. OPPENHEIMER (C.). — Das Atmungsferment und der oxydative Abbau. (*Münch medizin. Wochenschrift*, 1928, **23**, 981.)
319. PARHON (C.-I.) et CAHANE (M.). — Sur la teneur en soufre et sur l'hydratation des surrénales chez les Rats soumis au traitement thyroïdien ou thyroxinique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 641.)
320. PARHON (C.-I.) et CAHANE (M.). — Sur la thiémie chez quelques espèces animales. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 466.)
321. PERLZWEIG (W.-A.) and DELRUE (G.). — The use of the starch-iodine end-point in Tunnicliffe's method for the determination of glutathione tissues. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1416-1418.)
322. PINCUSSEN (L.) und YOKOTA (S.). — Über Veränderungen des Stoffwechsels unter Bestrahlung. IX. Der Glutathiongehalt der organe. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **239**, 303-309.)
323. PIRIE (N.-W.). — The preparation of glutathione from yeast and liver. (*Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 51.)
324. PIRIE (N.-W.). — The cuprous derivatives of some sulphhydryl compounds. (*Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 614-628.)
325. PIRIE (N.-W.). — The oxidation of sulphhydryl compounds by hydrogen peroxide. I. Catalysis of oxidation of cysteine and glutathione by iron and copper. (*Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1565-1579.)
326. PIRIE (N.-W.). — Cuprous glutathione. With a note on the cristallography of glutathione by J.-D. Bernal. (*Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 75-79.)
327. PIRIE (N.-W.) and PINHEY (K.-G.). — The titration curve of glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 321-333.)

328. PRINGSHEIM (H.), BORCHARDT (H.) und HUPFER (H.). — Über Glutathion als Aktivator der fermentativen Stärkewerzuckerung. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **238**, 467-477.)
329. PRINGSHEIM (H.), BORCHARDT (H.) und HUPFER (H.). — Über Glutathion als Komplement der Amylasen. (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **250**, 109-204.)
330. QUASTEL (J.-H.) and STEPHENSON (M.). — Experiments on strict anaerobes. I. The relationship of *B. sporogenes* to oxygen. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 1125-1137.)
331. QUASTEL (J.-H.), STEWART (C.-P.) and TUNNICLIFFE (H.-E.). — On glutathione. IV. Constitution. (*Biochem. Journ.*, 1923, **17**, 586.)
332. QUASTEL (J.-H.) and WOOLDRIDGE (W.-R.). — Reduction potential, energy exchange and all growth. (*Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 115.)
333. RANDOIN (Mme) et FABRE (R.). — Recherches comparatives sur la teneur en glutathion de quelques tissus et du sang, chez le Pigeon normal, chez le Pigeon sous-alimenté et chez le Pigeon privé de vitamines B. (*C. R. Ac. Sc.*, 1927, **185**, 151.)
334. RANDOIN (Mme) et FABRE (R.). — Glutathion et avitaminose B chez le Pigeon. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 1027.)
335. RANDOIN (Mme) et FABRE (R.). — Recherches comparatives sur la teneur en dérivés sulfhydrylés des muscles striés du foie, et du sang chez le Rat normal, chez le Rat sous-alimenté et chez le Rat privé de vitamines B. (*C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 815.)
336. RAPKINE (L.). — Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. (*Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1931, **7**, 382-418.)
- RAPKINE (L.). — Sur l'action de l'acide monoiodacétique sur le glutathion et la cystéine. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 790.)
337. RAYMOND (A.-L.). — Cozymase. Its relation to phosphatase activity. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1928, **79**, 637-648.)
338. REY-PAILHADE (J. DE). — Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid. (*C. R. Ac. Sc.*, 1888, **106**, 1683.)
339. REY-PAILHADE (J. DE). — Nouvelles recherches physiologiques sur la substance organique hydrogénant le soufre à froid. (*C. R. Ac. Sc.*, 1888, **107**, 43.)

340. REY-PAILHADE (J. DE). — Recherches expérimentales sur le philothion, principe immédiat répandu dans les deux règnes vivants. Son rôle physiologique probable dans l'absorption de l'oxygène par la cellule vivante. (Paris, Masson, 1891.)
341. REY-PAILHADE (J. DE). — Expériences montrant à la fois le pouvoir oxydant et le pouvoir réducteur des tissus. (*C. R. Soc. Biol.*, 1897, **4**, 519.)
342. REY-PAILHADE (J. DE). — Les eaux minérales et la catalyse. Rôle du philothion dans le traitement par les eaux sulfurées. (*Soc. Ther.*, 1913.)
343. REY-PAILHADE (J. DE). — Sur deux philothions α et β (*Bull. Soc. Chim.*, 1923, **33**, 167.)
344. REY-PAILHADE (J. DE). — Sur l'existence d'un philothion α et d'un philothion β . (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 518.)
345. REY-PAILHADE (J. DE). — Sur l'emploi du soufre en chimie biologique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 1143-1145.)
346. REY-PAILHADE (J. DE). — Le rôle du soufre dans la vie animale et le philothion. (*Soc. Ther.*, 1929.)
347. REY-PAILHADE (J. DE). — La thérapeutique et la constitution des substances des organes. Rôle du philothion, du glutathéion. (*Soc. Ther.*, 1930.)
348. ROSENTHAL (S.-M.). — Action of sulfhydryl, iron and cyanide compounds on the oxygen consumption of living cells. (*Pub. Health. rep. U. S. P. H. S.*, 1931, **46**, 521-539.)
349. RUBINO, COLLAZO et VARELA. — *Rev. Assoc. Med. Argent.*, 1928, **41**, 587.
350. RUGGERI (E.). — *Arch. Ital. Chir.*, 1931, **28**, 69-87.
351. SAGARA (J.). — Embryochemische Untersuchungen mittels der Injektions methode. IV. Über die Glutathion bildung im Organismus des Hühnerembryos. (*Zeit. f. physiol. chem.*, 1930, **188**, 124-126.)
352. SAKUMA (S.). — Ueber die sogenannte Autoxydation des Cysteins. (*Biochem. Ztschr.*, 1923, **142**, 68-78.)
353. SALT (H.-B.). — The ergonithioneine content of the blood in health and disease. (*Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1712-1719.)
354. SANNIÉ (C.). — Action de protection de divers antidotes sur l'intoxication par l' α -aminopropionitrile. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 562-580.)

355. SCHELLING (V.). — A study of the blood glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1932, **96**, 17-24.)
SCHELLING (V.). — Study on the metabolism of glutathione. (*Amer. Journ. of Physiol.*, 1932, **102**, 714-718.)
356. SCHMIDT (C.-L.-A.), APPLEMAN (W.-K.) and KIRK (P.-L.). — The effect of the position of substitution on the apparent dissociation constants of certain amino-acids. (*Journ. of biol. Chem.*, 1929, **81**, 723-726.)
357. SHEARER (C.). — On the oxidation processes of the echinoderm egg during fertilisation. (*Proc. of the Roy. Soc.* (sér. B), 1922, **93**, 213-229.)
358. SIMMS (H.-S.). — The nature of the ionizable group in proteins. (*Journ. gen. Physiol.*, 1928, **11**, 629-640.)
359. SORU (E.). — Le potentiel d'oxydo-réduction des tumeurs spontanées de la souris et de la sarcome de Jensen. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 327.)
360. STEWART (C.-D.) and TUNNICLIFFE (H.-E.). — Glutathione. Syntheses. (*Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 207.)
361. SULLIVAN (M.-X.). — Differentiating reactions for cysteine, cystine and glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1926, **67**, 11.)
362. SULLIVAN (M.-X.). — Distinctive test for cysteine. (*Pub. Health. Rep. U. S. P. H. S.*, 1926, **41**, 1030-1056.)
363. SULLIVAN (M.-X.) et HESS (W.-C.). — Estimation of cysteine in the presence of glutathione. V. S. Treas. Depart. (*Pub. Health. Rep.*, 1931, **46**, 390-393.)
364. SZENT-GYÖRGYI (A. von). — Studien über die biologische oxydation. I. Mitteilung : Ueber die Sauerstoffaufnahme des Systems Linolensäure. SH. Gruppe. (*Biochem. Ztschr.*, 1924, **146**, 245-258.)
365. SZENT-GYÖRGYI (A. von). — Studien über die biologische Oxydation. III. Mitteilung : Ueber das Oxyd der SH-Gruppe and über die Oxydation durch Aethylperoxyd. (*Biochem. Ztschr.*, 1924, **149**, 188-190.)
366. TATSUZAWA (S.). — *Sei. i. kivaïmed. J.*, 1932, **51**, 48.
367. THOMPSON (J.-W.) et VÆGTLIN (C.). — Glutathion content of normal animals. (*Jour. of biol. Chem.*, 1926, **70**, 793-800.)
368. THUNBERG (T.). — Auto-oxidizable substances and systems. III. Thiocompounds. (*Scand. Arch. f. Physiol.*, 1914, **30**, 285.)

369. THURLOW (S.). — Studies on xanthine oxidase. IV. Relation of xanthine oxidase and similar oxidising systems to Bach's oxygenase. (*Biochem. Journ.*, 1925. **19**, 175-187.)
370. TODA (S.). — Über « Wasserstoffaktivierung » durch Eisen. (*Biochem. Ztschr.*, 1926. **172**, 34-35.)
371. TSUBURA (S.). — Studies on the physiology of plain muscle. III. Comparison of the reducing properties of plain and striated muscle. (*Biochem. Journ.*, 1925. **19**, 397-403.)
372. TUNNICLIFFE (W.-P.). — The oxidation of reduced Glutathione and other sulphhydryl compounds. (*Proc. of the Roy. Soc. (ser. B)*, 1923. **94**, 266-297.)
373. TUNNICLIFFE (H.-E.). — The occurrence and quantitative estimation of glutathione in tissues. (*Biochem. Journ.*, 1925. **19**, 194-198.)
374. TUNNICLIFFE (H.-E.). — Glutathione. Relations between the tissues and the oxidised dipeptide. (*Biochem. Journ.*, 1925. **19**, 199-206.)
375. UNNA (P.-G.). — Die Reduktionsorie und Sauerstoffnie des tierischen Gewebes. (*Archiv. f. mikr. Anat.*, 1911. **78**.)
UNNA (P.-G.). — Die Sauerstoffnie und Reduktionsorie. (*Archiv. f. mikr. Anat.*, 1915. **87**.)
376. UYEI (N.). — *J. Inf. Dis.*, 1926. **39**, 73 et 467.
377. VARELA (E.), APOLO und VILAR. — Das Glutathion in Blute bei pathologischen Zuständen. (*Klin. Woch.*, 1930. **9**, 1029-1030.)
379. VARELA (E.), APOLO, DUOMARCO und VILAR. — *Klin. Woch.*, 1931. **10**, 106.
380. VARELA (E.), APOLO und ESCULIES. — *Actas del Congreso inten. de biológica de Montevideo*, 1931. **4**, 1068.
381. VARELA (E.), APOLO und VILAR. — Das Glutathion im Blute bei pathologischen Zuständen. (*Klin. Wochers.*, 1930. **9**, 1029-1030.)
382. VARELA (B.), DUOMARCO (J.) et MURRILLA (A.). — Modifications du glutathion réduit du sang et des organes dans l'anémie expérimentale produite par des saignées répétées chez le chien et le lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931. **106**, 837.)
383. VARELA (B.), DUOMARCO (J.) et VILAR (J.). — Modifications du Glutathion réduit du sang, dans les anémies humaines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 835.)

384. VARELA (B.), MUNILLA et DUOMARCO. — *Rev. Soc. Med. Argent.*, 1929, 461.
385. VARELA (B.), MUNILLA et DUOMARCO. — *Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.*, 1930, **72**, 457-471.
386. VARELA (B.), MUNILLA (A.) et DUOMARCO (J.). — Modifications du glutathion du sang et du foie dans les ictères. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 533.)
387. VIGNEAUD (V. DU), FITCH (A.), PEKAREK (E.) and LOCKWOOD (W.-W.). — The inactivation of crystalline insulin by cysteine and glutathione. (*Journ. of biol. chem.*, 1931, **94**, 233-242.)
388. VILLELA (G.-G.) et CAMPOS (J.-G.). — Glutathion du sang humain normal. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 83.)
389. VIOLLE (H.). — Neutralisation de HCN par le glucose. (*Bull. Ac. Méd.*, 1926, **95**, 664.)
390. VIVARIO (R.) et LECLOUX (J.). — Sur la formation de glutathion au cours de la croissance. (*Arch. intern. Physiol. et Path. exp.*, 1930, **32**, 1-14.)
391. VÆGTLIN (C.), DYER (H.-A.) and LEONARD (C.S.). — On the specificity of the so called arsenic receptor in the higher animals. (*Journ. of Pharm. and exp. Ther.*, 1925, **25**, 297-307.)
392. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-M.) and DYER (H.). — Quantitative estimation of the reducing power of normal and cancer tissue. (*Journ. of Pharm. and Exp. Therap.*, 1924, **24**, 305.)
393. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-M.) and DYER (H.-A.). — *Proc. Nat. Ac. Sc.*, 1925, **11**, 344.
394. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-M.) and DYER (H.-A.). — Biological significance of cystine and glutathione. I. The mechanism of the cyanide action. (*J. Pharm. Exp. Therap.*, 1926, **27**, 467-483.)
395. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-H.) and ROSENTHAL (S.M.). — The catalytic action of copper in the oxydation of crystalline glutathione. (*Journ. of Pharmacol. exp. Therap.*, 1931, **42**, 256.)
396. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-H.) and ROSENTHAL (S.M.). — The oxydation catalyses of crystalline glutathione with particular reference to copper. (*Journ. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 435-453.)

397. VÆGTLIN (C.), JOHNSON (J.-H.) and ROSENTHAL (S.M.). — Influence of arsenicals and crystalline glutathione on the oxygen consumption of tissues. (*U. S. Treas. Depart. Pub. Hæalth. Rep.*, 1931, **46**, 339-354.)
398. VÆGTLIN (S.) and THOMPSON (J.-W.). — Glutathione content of tumor animals. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1926, **70**, 801-806.)
399. WÆLSCH (H.). — Die biologische Bedeutung des Glutathions. (*Med. Klinik*, 1933, **29**, 1166-1168.)
400. WÆLSCH (H.) und WEINBERGER (E.). — Glutathionspiegel des Bluts im Fieber. (*Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1933, **169**, 625-632.)
401. WALDSCHMIDT (E.), WEIL (L.) und PURR (A.). — Ueber die Steuerung des intracellulären Urnsatzes von Erweiss und Kohlenhydrat durch Sulfhydryl. (*Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, **215**, 64-66.)
402. WALKER (E.). — *Journ. physiol.*, 1924, **59**, 32.
403. WALKER (E.). — A colour reaction for disulphids. (*Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1082-1085.)
404. WALKER (E.). — The sulfhydryl reaction of skin. (*Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1085-1087.)
405. WARBURG (O.) und NEGELEIN (Fr.). — Ueber die Oxydation des Cystins und anderer Aminosäuren an Blutkohle. (*Biochem. Zeitschr.*, 1921, **113**, 257.)
406. WARBURG (O.), und SAKUMA (T.). — Ueber die sogenannte Autoxydation des Cysteins. (*Pflüger's Arch.*, 1923, **200**, 203.)
407. WATRIN (J.). — La mélanogenèse du mamelon chez le Cobaye. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1455.)
408. WIELAND (H.). — Ueber den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. (*Ber. Chem. Ges.*, 1921, **54**, 2353-2376.)
409. WILLHEIM (R.) und STERN (K.). — Zur Frage des Glutathion gehaltes in Blute Krebskranken. (*Bioch. Ztschr.*, 1933, **260**, 180-186.)
410. WILLIAMS (J.-L.) et DRISSEN (E.-M.). — Oxidation-reduction potentials of certain sulfhydryl compounds. (*Journ. Biol. Chem.*, 1930, **87**, 441-451.)
411. WINTER (K.-A.) und REISS (M.). — Studien über die Funktion der Nebennierenrinde. V. Die rolle des Nebennierenrinden hormons im Schwefelstowechsel. (*Endokrinologie*, 1932, **10**, 404.)

412. WINTER, REISS et VALDECASAS. — Studien über die Funktion der Nebennierenrinde. VII. Nebennierenrinde und Glutathion. (*Endokrin.*, 1932, **11**, 171.)
 413. WOLFF (R.) et Mlle MAUJEAN (S.). — Sur la teneur en glutathion réduit des tissus du cobaye. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 624.)
 414. WOLFF (R.) et Mlle MANJEAN (S.). — Action des sels de magnésium sur la teneur en glutathion réduit des organes du chien. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 779.)
 415. WOODWARD (G.-E.) and FRY (E.-G.). — The determination of blood glutathione. (*Journ. of biol. Chem.*, 1932, **97**, 465-482.)
 416. WURMSER (Lise). — Etude de quelques poudres d'organes au point de vue de leur teneur en glutathion et de leur pouvoir réducteur vis-à-vis de la cystine. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1933, **17**, 327-331.)
 417. WURMSER (R.). — Oxydations et réductions. (*Presses universitaires de France*, Paris, 1930.)
 418. YAOI (H.) and NAKAHARA (W.). — The glutathione content of chicken sarcoma : a rejoinder. (*Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1277-1278.)
 419. ZIMMET (D.). — Recherche du glutathion réduit et d'autres corps à fonction sulfhydryle, en présence d'acétone. (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 984.)
 420. ZUNZ (E.). — Recherches sur la teneur du sang en glutathion sous l'influence de l'insuline. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 223.)
 421. ZUNZ (E.). — Influence de la vagotonine sur la teneur du sang en glutathion réduit. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **110**, 93.)
 422. ZUNZ (E.). — Recherches sur l'influence de l'adrénaline sur la teneur du sang en glutathion réduit. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 591. *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1932, **8**, 345-347.)
 423. ZUNZ (E.). — Influence de la thyroxine, de la thyroglobuline et de la paroïdine sur la teneur du sang en glutathion réduit. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 1003.)
 424. ZUNZ (E.). — Influence de la cortine sur la teneur du sang en glutathion réduit. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 651.)
-

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. — <i>Introduction</i>	9
CHAPITRE II. — <i>Préparation du Glutathion</i>	23
I. Choix de la matière première	28
II. Etude des différentes phases de la préparation du glutathion	30
A. Obtention à partir de la levure, d'un liquide contenant le glutathion	36
1. Choix du liquide à employer pour l'extraction	30
2. Quantité de liquide à employer pour l'extraction	35
3. Temps de contact	36
B. Précipitation au sein de ce liquide du glutathion sous forme de sel de plomb	37
C. Décomposition de ce sel de Plomb par l'acide sulfurique et obtention d'une solution impure de glutathion	38
D. Précipitation du glutathion sous forme de sel cuivreux	39
E. Décomposition de ce sel de cuivre par l'hydrogène sulfuré	41
F. Cristallisation du glutathion	41
III. Mode Opératoire	43
Schéma de la préparation du glutathion	44
CHAPITRE III. — <i>Propriétés et Constitution du Glutathion</i>	45
I. Propriétés du glutathion	47
II. Constitution et formule du glutathion	49
III. Propriétés oxydo-réductrice du glutathion	55

A. Influence de divers facteurs	58
1. Influence du pH	58
2. Influence des métaux	59
3. Influence du disulfure	63
4. Influence de quelques composés inhibi- teurs d'oxydation	65
5. Influence de la lumière et de la tempéra- ture	66
B. Mécanisme de l'oxydo-réduction des dérivés sulfhydrylés	66
CHAPITRE IV. — <i>Caractérisation et dosage du glutathion</i> ..	71
I. Réactions caractéristiques du glutathion	73
A. Réactions des dérivés sulfhydrylés	73
1. Réaction fondée sur l'action du soufre ..	73
2. Réaction fondée sur la formation de sulfure de plomb	74
3. Réaction au nitroprussiate	74
4. Réaction de Feigl	77
5. Réaction phosphotungstique	78
6. Réaction phosphomolybdique	78
7. Réaction arsénophosphotungstique	78
B. Différenciation de la cystéine	78
II. Dosage du glutathion sous la forme réduite ..	80
A. Exposé critique des diverses méthodes pro-	
1. Méthodes iodométriques	82
2. Méthodes colorimétriques	91
a) Méthodes fondées sur la réaction au nitroprussiate	91
b) Méthodes utilisant un excès de ferri- cyanure pour oxyder le glutathion et do- sant le ferrocyanure formé	92
c) Méthodes fondées sur l'emploi du réac- tif phosphotungstique	93
d) Méthode fondée sur la réduction du réactif arsénophosphotungstique par le glutathion	94
e) Méthode néphélométrique de Moncorps et Schmid	94
B. Recherche des conditions optima de préci- sion du dosage	95
1. Prélèvement du sang ou des organes	95
2. Durée de la manipulation	96
3. Température	96

4. Choix du déféquant	96
a) Conditions que doit remplir un déféquant	97
b) Principaux déféquants préconisés pour le dosage du glutathion réduit	98
c) Etude des divers modes de défécation proposés	100
III. Dosage du glutathion existant à l'état oxydé ..	108
Réduction du glutathion oxydé	109
Méthode de dosage utilisée au cours de nos recherches	115
CHAPITRE V. — <i>Le glutathion chez les êtres vivants</i>	117
I. Diffusion du glutathion chez les êtres vivants ..	119
1. Levures et bactéries	119
2. Végétaux	120
3. Animaux	121
II. Répartition du glutathion dans les tissus	122
1. Animaux autres que les Mammifères	122
2. Mammifères autres que l'Homme	123
3. Homme	128
CHAPITRE VI. — <i>Facteurs de variation du taux du glutathion</i>	131
I. Facteurs physiologiques de variation du taux du glutathion	133
1. Influence du régime sur les teneurs en glutathion	134
2. Le glutathion et la croissance	137
3. Le glutathion et l'état sexuel	138
4. Le glutathion et la gravidité	145
5. Le glutathion et les glandes endocrines ..	146
II. Action des divers facteurs expérimentaux sur la variation du taux du glutathion.....	150
1. Substances dont l'administration peut entraîner des variations du taux du glutathion	150
a) Substances soufrées	150
b) Substances diverses	151
c) Hormones	151
d) Substances hyperthermisantes	154
2. Action de l'irradiation sur le taux du glutathion	156
3. Modifications de la teneur en glutathion des muscles	156
4. Action de l'asphyxie sur le taux de glutathion	157
III. Le glutathion dans les états pathologiques	157

CHAPITRE VII. — <i>Rôle antitoxique du glutathion</i>	169
CHAPITRE VIII. — <i>Action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique</i>	173
I. Généralités sur l'intoxication cyanhydrique	175
II. Recherche de la dose toxique d'acide cyanhydrique	179
III. Essais de survie par injections de glutathion ..	182
IV. Recherche des variations du taux de glutathion dans l'intoxication cyanhydrique avec ou sans administration de glutathion	186
V. Recherche d'une microméthode de dosage des cyanures et des sulfocyanures	193
A. Etude des méthodes usuelles	193
1. Méthode argentimétrique en milieu ammoniacal	193
2. Méthode iodométrique de Fordos et Gélis.	194
3. Méthode de Lavialle et Varenne	194
B. Etude du microdosage colorimétrique des cyanures, fondé sur la réaction du Bleu de Prusse	195
1. Sensibilité de la réaction	196
2. Recherche de la relation entre l'intensité de la teinte et la quantité d'acide cyanhydrique	197
3. Recherche de la constance de la coloration pour une dose donnée	198
4. Technique utilisée	202
5. Vérification de la technique	203
C. Mode opératoire suivi, pour le dosage du cyanure et du sulfocyanure dans les viscères.	204
VI. Dosage des cyanures et des sulfocyanures dans les organes des animaux intoxiqués par l'acide cyanhydrique	205
VII. Mécanisme de l'action du glutathion dans l'intoxication cyanhydrique	213
CHAPITRE IX. — <i>Conclusions</i>	215
<i>Bibliographie</i>	221

